

**EINFLUSS VON CAROTINOIDEN UND VON LICHT
AUF DEN SEHFARBSTOFFGEHALT
VON SPODOPTERA LITTORALIS (LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE)**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
an der Fakultät für Biologie
der Ruhr-Universität Bochum

von

MARTIN PIEPER
aus Arnsberg

Eingereicht im Oktober 1988

Einfluss von Carotinoiden und von Licht
auf den Schmelzstoffgehalt
von Sporophyllen Litoralis (Litoralis noctuidae)

Digitized by the Internet Archive
in 2026

**EINFLUSS VON CAROTINOIDEN UND VON LICHT
AUF DEN SEHFARBSTOFFGEHALT
VON SPODOPTERA LITTORALIS (LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE)**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
an der Fakultät für Biologie
der Ruhr-Universität Bochum

von

MARTIN PIEPER
aus Arnsberg

Eingereicht im Oktober 1988

1.	Einleitung	1
2.	Kindheit und Jugend	2
3.	Studium und Beruf	3
4.	Heimliche und öffentliche	4
5.	Die Zeit der Jugend	5
6.	Die Zeit der Jugend	6
7.	Die Zeit der Jugend	7
8.	Die Zeit der Jugend	8
9.	Die Zeit der Jugend	9
10.	Die Zeit der Jugend	10
11.	Die Zeit der Jugend	11
12.	Die Zeit der Jugend	12
13.	Die Zeit der Jugend	13
14.	Die Zeit der Jugend	14
15.	Die Zeit der Jugend	15
16.	Die Zeit der Jugend	16
17.	Die Zeit der Jugend	17
18.	Die Zeit der Jugend	18
19.	Die Zeit der Jugend	19
20.	Die Zeit der Jugend	20
21.	Die Zeit der Jugend	21
22.	Die Zeit der Jugend	22
23.	Die Zeit der Jugend	23
24.	Die Zeit der Jugend	24
25.	Die Zeit der Jugend	25
26.	Die Zeit der Jugend	26
27.	Die Zeit der Jugend	27
28.	Die Zeit der Jugend	28
29.	Die Zeit der Jugend	29
30.	Die Zeit der Jugend	30
31.	Die Zeit der Jugend	31
32.	Die Zeit der Jugend	32
33.	Die Zeit der Jugend	33
34.	Die Zeit der Jugend	34
35.	Die Zeit der Jugend	35
36.	Die Zeit der Jugend	36
37.	Die Zeit der Jugend	37
38.	Die Zeit der Jugend	38
39.	Die Zeit der Jugend	39
40.	Die Zeit der Jugend	40
41.	Die Zeit der Jugend	41
42.	Die Zeit der Jugend	42
43.	Die Zeit der Jugend	43
44.	Die Zeit der Jugend	44
45.	Die Zeit der Jugend	45
46.	Die Zeit der Jugend	46
47.	Die Zeit der Jugend	47
48.	Die Zeit der Jugend	48
49.	Die Zeit der Jugend	49
50.	Die Zeit der Jugend	50
51.	Die Zeit der Jugend	51
52.	Die Zeit der Jugend	52
53.	Die Zeit der Jugend	53
54.	Die Zeit der Jugend	54
55.	Die Zeit der Jugend	55
56.	Die Zeit der Jugend	56
57.	Die Zeit der Jugend	57
58.	Die Zeit der Jugend	58
59.	Die Zeit der Jugend	59
60.	Die Zeit der Jugend	60
61.	Die Zeit der Jugend	61
62.	Die Zeit der Jugend	62
63.	Die Zeit der Jugend	63
64.	Die Zeit der Jugend	64
65.	Die Zeit der Jugend	65
66.	Die Zeit der Jugend	66
67.	Die Zeit der Jugend	67
68.	Die Zeit der Jugend	68
69.	Die Zeit der Jugend	69
70.	Die Zeit der Jugend	70
71.	Die Zeit der Jugend	71
72.	Die Zeit der Jugend	72
73.	Die Zeit der Jugend	73
74.	Die Zeit der Jugend	74
75.	Die Zeit der Jugend	75
76.	Die Zeit der Jugend	76
77.	Die Zeit der Jugend	77
78.	Die Zeit der Jugend	78
79.	Die Zeit der Jugend	79
80.	Die Zeit der Jugend	80
81.	Die Zeit der Jugend	81
82.	Die Zeit der Jugend	82
83.	Die Zeit der Jugend	83
84.	Die Zeit der Jugend	84
85.	Die Zeit der Jugend	85
86.	Die Zeit der Jugend	86
87.	Die Zeit der Jugend	87
88.	Die Zeit der Jugend	88
89.	Die Zeit der Jugend	89
90.	Die Zeit der Jugend	90
91.	Die Zeit der Jugend	91
92.	Die Zeit der Jugend	92
93.	Die Zeit der Jugend	93
94.	Die Zeit der Jugend	94
95.	Die Zeit der Jugend	95
96.	Die Zeit der Jugend	96
97.	Die Zeit der Jugend	97
98.	Die Zeit der Jugend	98
99.	Die Zeit der Jugend	99
100.	Die Zeit der Jugend	100

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	6
2.	Material und Methoden	16
2.1.	Versuchstiere	16
2.1.1.	Aufzucht und Haltung	16
2.1.2.	Futter	17
2.1.2.1.	Naturfutter	17
2.1.2.2.	Halbsynthetische Diät	18
2.1.2.3.	Diät mit Zusatzstoffen	18
2.2.	Injektion	19
2.2.1.	Apparatur und Geräte	19
2.2.2.	Durchführung der Injektionen	19
2.2.2.1.	Injektionen in die Augen der Imagines	19
2.2.2.2.	Injektion von Farbstoffen in die Augen	20
2.2.2.3.	Injektionen in die Hämolymphe der Imagines	20
2.2.2.4.	Injektionen in die Raupen	20
2.2.2.5.	Injektionen in die Puppen	21
2.2.3.	Für die Injektionen verwendete Substanzen	21
2.2.4.	Herstellung der Retinal-Isomere	21
2.2.5.	Hälterung der Tiere nach den Injektionen	22
2.3.	Präparation und Reinigung der Retinae	22
2.4.	Extraktionen	23
2.4.1.	Extraktion der Sehfärbstoffe	23
2.4.2.	Extraktion der Carotinoide	23
2.4.2.1.	Extraktion aus der Nahrung und aus den Faeces .	23
2.4.2.2.	Extraktion aus der Hämolymphe der Raupen	24
2.4.2.2.1.	Gewinnung der Hämolymphe	24
2.4.2.2.2.	Extraktion der Hämolymphe	24
2.5.	Photometrie	24
2.5.1.	Bestimmung des Sehfärbstoffgehaltes	24
2.5.2.	Bestimmung des Carotinoidgehaltes	25
2.6.	Gelelektrophorese	25
2.6.1.	Probenvorbereitung	26
2.6.2.	Proteinbestimmung	26
2.6.3.	Zusammensetzung des Gels	27
2.6.4.	Auftragen der Proben	28
2.6.5.	Elektrophorese	29
2.6.6.	Behandlung der fertigen Gele	29
2.6.7.	Reduktion des Sehfärbstoffes mit Dimethylamin- Boran	31
2.6.8.	Photometrische Auswertung der Gele	31
2.7.	Autoradiographie	32
2.7.1.	Injektion markierter Aminosäuren	32
2.7.2.	Elektrophorese	32
2.7.3.	Exposition und Entwicklung der Autoradiogramme .	32

2.8.	Dünnschichtchromatographie (HPTLC)	33
2.8.1.	Apparatur	33
2.8.2.	Aufarbeitung der Proben	33
2.8.2.1.	Extraktion aus den Retinae	33
2.8.2.2.	Extraktion aus Digitonin-Extrakten	33
2.8.3.	Auftragen der Proben	34
2.8.4.	Chromatographie	34
2.8.5.	Anfärben der Chromatogramme	34
2.9.	Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (HPLC)	35
2.9.1.	Apparatur	35
2.9.2.	Aufarbeitung der Proben	35
2.9.3.	Auftrennung des Probengemisches	36
3.	Ergebnisse	37
3.1.	Der Normalzustand	37
3.1.1.	Aufzucht mit verschiedenen Futterpflanzen	37
3.1.2.	Das Sehfarbstoffsystem	39
3.1.2.1.	Charakterisierung der Sehfarbstoffe	40
3.1.2.2.	Charakterisierung des Opsins	43
3.1.2.3.	Charakterisierung des Chromophors	44
3.1.3.	Besonderheiten der gelbäugigen Mutante	47
3.2.	Fütterungsexperimente	49
3.2.1.	Aufzucht mit der Diät	49
3.2.2.	Carotinoidgehalt des Futters	51
3.2.3.	Aufzucht mit der Diät mit Zusatzstoffen	52
3.2.4.	Bestimmung von verbrauchter Futtermenge und Puppengewicht	52
3.2.5.	Untersuchung von Hämolymphe und Fäces	55
3.2.6.	Besonderheiten der gelbäugigen Mutante	57
3.3.	Injektionsexperimente mit Carotinoiden	59
3.3.1.	Injektionen in die Raupen	59
3.3.1.1.	Sehfarbstoffgehalt nach Injektion	59
3.3.1.2.	Untersuchung der Hämolymphe nach Injektion	60
3.3.2.	Injektionen in die Puppen	61
3.3.3.	Injektionen in die Hämolymphe der Falter	61
3.3.4.	Injektionen in die Augen der Falter	63
3.3.4.1.	Farbstoffinjektionen	63
3.3.4.2.	Carotinoidinjektionen	63
3.3.4.2.1.	Sehfarbstoffgehalt nach Injektion	63
3.3.4.2.2.	Opsingehalt nach Injektion	67
3.3.4.2.3.	Chromophor nach Injektion	68
3.3.5.	Zeitabhängigkeit der Sehfarbstoffsynthese	71
3.3.6.	Injektion radioaktiv markierter Aminosäuren ...	72
4.	Diskussion	75
4.1.	Zuchtbedingungen	75
4.2.	Sehfarbstoffsystem	76
4.2.1.	Sehfarbstoffgehalt des Wildtyps in Abhängigkeit von den Lichtverhältnissen	76
4.2.2.	Die Sehfarbstoffe	78
4.2.3.	Sehfarbstoffgehalt der Mutante in Abhängigkeit von den Lichtverhältnissen	81
4.3.	Fütterungsexperimente	83

4.4.	Injektionsexperimente	88
4.4.1.	Injektionen in die Raupen	88
4.4.2.	Injektionen in die Puppen	90
4.4.3.	Injektionen in die Hämolymphe der Falter	91
4.4.4.	Injektionen in die Augen der Falter	92
4.4.5.	Injektionen radioaktiv markierter Aminosäuren .	97
5.	Zusammenfassung	100
6.	Literaturverzeichnis	102
7.	Danksagung	106

1. Einleitung

Das Interesse an der Erforschung der Lichtsinnesorgane verlagerte sich während der letzten hundert Jahre von anfänglich anatomisch-histologischen Untersuchungen immer mehr zur Physiologie und Biochemie des Sehvorganges. Neben den Arbeiten an den Augen der Wirbeltiere (Frosch, Rind) gewannen Untersuchungen an Wirbellosen immer mehr an Bedeutung.

Das Bleichen eines Sehfärbstoffes wurde erstmalig 1876 von Boll beschrieben. Er beobachtete, daß eine frisch präparierte Froschretina aufgrund von Lichteinwirkung ihre rötliche Farbe verliert. Die Regenerationsfähigkeit des gebleichten Sehpurpurs wurde 1879 von Kühne entdeckt, und das erste Absorptionsspektrum eines Sehfärbstoffes aus der Retina eines Menschen erstellte KOENIG 1894 (Boll und Kühne siehe BAUMANN, 1977). In seinem Buch über die "Physiologie der facettierten Augen der Krebse und Insecten" beschreibt EXNER 1891 sehr genau die optischen Eigenschaften von Komplexaugen und den Strahlengang des einfallenden Lichtes.

Vor mehr als 50 Jahren erkannte Wald den Zusammenhang zwischen Sehfärbstoffen und Vitamin A (WALD, 1933). Er stellte fest, daß beim Bleichen des Sehfärbstoffes von Wirbeltieren (Frosch, Rind) Retinal entsteht und daß nahrungsbedingter Vitamin A-Mangel unter anderem zu Nachtblindheit führt. Von Wald stammt auch das Modell des Zerfalls des Sehfärbstoffmoleküls in Vitamin A und eine Proteinkomponente (WALD, 1939).

Die Isolierung von Retinal aus den Köpfen dunkeladaptierter Honigbienen gelang GOLDSMITH (1958). Das 11-cis Isomer als Chromophor des Sehfärbstoffes wurde zunächst bei Wirbeltieren, und später von PAULSEN & SCHWEMER (1972) bei Insekten nachgewiesen. Sie untersuchten auch die Bedeutung des Retinals für die Neubildung von Sehfärbstoffmolekülen und konnten bei experimentell an Sehfärbstoff verarmten Fliegen durch Injektion von 11-cis Retinal die Sehfärbstoffsynthese induzieren (PAULSEN & SCHWEMER, 1983).

Seit Walds Entdeckung, daß Retinal die chromophore Gruppe der

Sehfarbstoffe von Wirbeltiere ist, gelang dieser Nachweis auch für andere Tiergruppen. Es wurde daher zunächst allgemein angenommen, daß dies im gesamten Tierreich der Fall ist. Diese Sehfarbstoffe werden als Rhodopsine bezeichnet. Ausnahmen stellen die Sehfarbstoffe mancher Fische und einiger Amphibien dar, die das 3-Dehydroretinal als Chromophor enthalten und als Porphyropsine bezeichnet werden.

VOGT fand 1983 bei dünnenschichtchromatographischen Untersuchungen von Extrakten aus Retinae von Calliphora einen Aldehyd, der einen stärker polaren Charakter aufwies als das erwartete Retinal. Daß dieser Aldehyd aus der chromophoren Gruppe des Sehfarbstoffes stammte, konnte durch das Auftreten unterschiedlicher Stereoisomere in Abhängigkeit von der Vorbelichtung der extrahierten Augen nachgewiesen werden (cis- und trans-Isomere von Rhodopsin bzw. Metarhodopsin). Die Annahme, daß es sich bei dem Aldehyd um das 3-Hydroxyretinal handelt, konnte durch weitere Untersuchungen bestätigt werden. In der Folgezeit wurde 3-Hydroxyretinal auch in den Sehfarbstoffen anderer Insektengruppen entdeckt (VOGT, 1984; SEKI et al., 1987).

Mit dem Nachweis von Zeaxanthin und Lutein in den Extrakten aus Retinae von Calliphora und mit der Identifizierung des 3-Hydroxyretinals als Chromophor von Sehfarbstoffen verstärkte sich das Interesse an den Carotinoiden und ihrer Bedeutung als Vorstufen für den Chromophor der Sehfarbstoffe.

Die Carotinoide bilden eine große Gruppe von Naturstoffen, die im Tier- und Pflanzenreich weit verbreitet sind und vielfältige Aufgaben erfüllen. Neben ihrer Rolle als Farbstoffe (z.B. in Blüten, Früchten und Blättern bei Pflanzen, sowie Federn, Cuticula und Haut bei Tieren) sind sie -direkt oder als Vorstufe- an vielen lichtabhängigen Reaktionen bei Pflanzen (z.B. Photosynthese) und Tieren (z.B. Sehvorgang) beteiligt.

Carotinoide sind eine Klasse von Hydrocarbonen (Carotine, z.B. β -Carotin) und ihren oxigenierten Derivaten (Xanthophylle, z.B. Zeaxanthin). Sie bestehen aus acht Isopreneinheiten, die so ver-

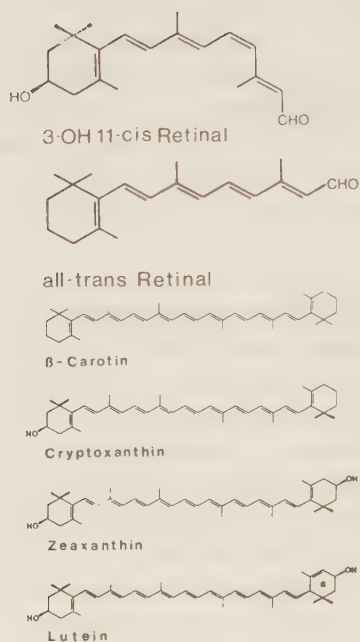


Abb. 1: Retinale und Carotinoide

knüpft sind, daß ihre Anordnung in der Mitte des Moleküls umgekehrt wird. Damit sind die beiden zentralen Methylgruppen in 1,6-Stellung verknüpft; die anderen, nicht-terminalen Methylgruppen weisen eine 1,5-Verknüpfung auf. Alle Carotinoide können formal auf eine azyklische $C_{40}H_{56}$ -Struktur zurückgeführt werden. Sie enthält eine lange Kette von konjugierten Doppelbindungen und kann durch Hydrogenierung, Dehydrogenierung, Zyklisierung, Oxidation oder eine Kombination dieser Reaktionen modifiziert werden. Abbildung 1 zeigt einige für den Sehvorgang relevante Carotinoide und Retinale.

Alle zur Photosynthese befähigten Organismen und einige nicht photosynthetisch tätige Mikroorganismen können Carotinoide de novo synthetisieren, wogegen Tiere dazu nicht in der Lage sind. In Pflanzen kommen Carotinoide in praktisch allen Geweben vor.

Photosynthetisierende Geweben enthalten in den Chloroplasten vor allem β -Carotin, Lutein, Violaxanthin und Neoxanthin. Diese sind mit geringeren Mengen α -Carotin, Zeaxanthin und anderen Carotinoiden vergesellschaftet.

In pflanzlichem Gewebe dienen die Carotinoide unter anderem als Schutz vor Strahlungsschäden. Chlorophyll und andere Porphyrine können als "sensitizer pigments" im angeregten Zustand (3S) durch Energieübertragung Sauerstoff aus dem Triplett-Grundzustand (3O_2) in den angeregten Singulett-Zustand (1O_2) überführen. Dieser kann aufgrund seiner hohen Reaktivität Makromoleküle (z.B. Enzyme, Membranen) oxidieren und damit deren Funktion beeinträchtigen (SCOLNIK, 1987). Carotinoide können nun Energie von den angeregten Molekülen (3S , 1O_2) aufnehmen, und diese somit "unschädlich" machen. Ähnliche Schutzfunktionen werden auch für Carotinoide in den γ -Rezeptorzellen im Fliegenauge diskutiert (KIRSCHFELD et al., 1988; KRINSKY, 1979).

Die Entdeckung des 3-Hydroxyretinals als Chromophor des Sehfärbstoffes der Fliege Calliphora führte dazu, daß sich das Hauptaugenmerk bei der weiteren Erforschung dieses Chromophors auf die Dipteren konzentrierte. Die Untersuchungen bei anderen Insektengruppen beschränkte sich fast ausschließlich auf den qualitativen Nachweis des Chromophors, um die Verbreitung des 3-Hydroxyretinals zu erfassen (VOGT, 1984; SEKI et al., 1987). Nach bisherigem Kenntnisstand beschränkt sich dessen Vorkommen auf die Stammgruppe der Mecopteroidea (Diptera, Trichoptera, Mecoptera und Lepidoptera). Bei anderen Arthropoden, etwa bei Krebsen, konnte bisher kein 3-Hydroxyretinal gefunden werden.

Die meisten der oben dargestellten Erkenntnisse wurden durch Untersuchungen an Dipteren gewonnen. Es erschien daher sinnvoll, das Sehfärbstoffsystem eines anderen Vertreters aus der Stammgruppe der Mecopteroidea näher zu betrachten. Mit der Schmetterlingsart Spodoptera littoralis Bois. (Lepidoptera, Noctuidae) (Abb. 2) wurde ein Versuchstier gewählt, das sich in einigen wesentlichen Merkmalen deutlich von den Dipteren unterscheidet: Die

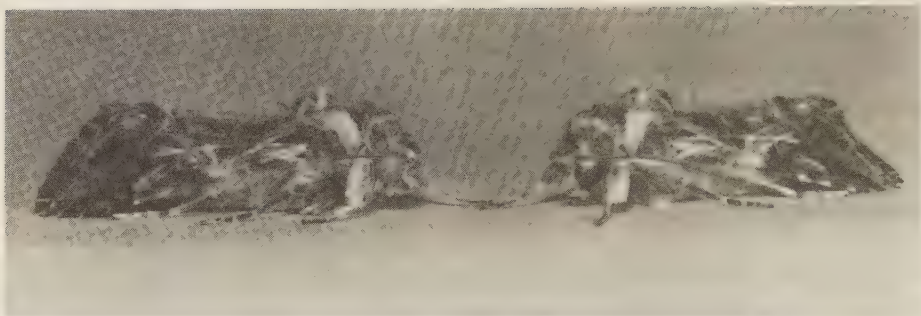


Abb. 2: Spodoptera littoralis Boisd. (Lepidoptera, Noctuidae), Wildtyp (rechts), gelbäugige Mutante (links)

Raupen von S. littoralis sind im Gegensatz zu den Maden von z.B. Calliphora ausschließlich phytophag. Daraus ergeben sich Unterschiede für die mit der Nahrung aufgenommenen Carotinoide. Die kurzlebigen Imagines sind nachtaktiv und besitzen ein lichtempfindliches Superpositionsauge, wogegen die tagaktiven Dipteren Appositionsaugen haben.

Verschiedene Arten der Gattung Spodoptera sind auf dem afrikanischen Kontinent und in Teilen Asiens und Australiens wegen ihrer oft in großen Mengen auftretenden Raupen ein gefürchteter Schädling in der Landwirtschaft.

Eine bevorzugte Futterpflanze der verwendeten Art S. littoralis ist in Ägypten die Baumwolle (BISHARA, 1934). Von den Raupen werden nicht nur die Blätter gefressen, sondern die größeren Raupen befallen auch Knospen und Baumwollkapseln, so daß die gesamte Ernte vernichtet werden kann. Auf diese Lebensweise ist auch der Name der Raupen "cotton worm" zurückzuführen. Die polyphagen Raupen beschränken sich aber nicht auf den Befall von Baumwollpflanzen, sondern sind -je nach geographischer Verbreitung- auch auf Mais, Tabak, Reis, Rizinus und anderen Pflanzen zu finden.

Die wirtschaftliche Bedeutung veranlaßt viele Forschungseinrichtungen, Laborzuchten dieser Art zu unterhalten, vorzugsweise für die Erprobung von Mitteln zur ihrer Bekämpfung als Schädlinge. Um den Aufwand zur Nahrungsbeschaffung möglichst gering zu halten und um eine gleichbleibende Qualität des Futters zu gewährleisten, wurden von diesen Instituten verschiedene halbsynthetische Diäten entwickelt, die der Zusammensetzung des Naturfutters möglichst weitgehend entsprechen (WYNIGER, 1974; DIMETRY, 1970; 2.1.2.1.).

Einige der Versuche wurden mit einer helläugigen Mutante von S. littoralis durchgeführt (DITTRICH & LUETKEMEIER, 1980) (Abb. 2 links), die sich vom Wildtyp durch eine starke Reduktion der Schirmpigmente (Ommochrome) unterscheidet. Die Komplexaugen zeigen deshalb -im Gegensatz zu den dunklen Augen des Wildtyps- eine gelbe Färbung.

Das Auge von S. littoralis gehört zu dem für nachtaktive Lepidopteren charakteristischen Typ des eukonen Superpositionsauges (EXNER, 1891; YAGI & KOYAMA, 1963). Die Feinstruktur ähnelt sehr stark der für das Komplexauge der Nachbarart S. exempta beschriebenen (AGEE, 1975; MEINECKE, 1981; ANTON-ERXLEBEN & LANGER, 1987;). Der lichtmikroskopisch sichtbare Aufbau des Auges von S. littoralis wird in Abb. 3 gezeigt.

Der Durchmesser des annähernd halbkugeligen Auges beträgt etwa 1,4 mm. Es besteht aus ca. 8000 Ommatidien. Der aus vier Kristallkegelzellen gebildete Kristallkegel wird von zwei primären Pigmentzellen umgeben. An die Kristallkegel schließen sich distale Ausläufer von Retinulazellen an. Jedes Ommatidium enthält acht dieser Zellen, wovon jeweils eine distal und basal, sowie sechs medial angeordnet sind. Die Ommatidien werden jeweils von einem Bündel Tracheen umgeben, die in ihrer Gesamtheit ein Tapeutum bilden. Das Ommatidium wird von sechs sekundären Pigmentzellen umgeben. Sie liegen -bei Betrachtung eines Querschnittes- in der Mitte eines Dreiecks, das von drei benachbarten Ommatidien gebildet wird. So ist jede sekundäre Pigmentzelle Bestandteil von

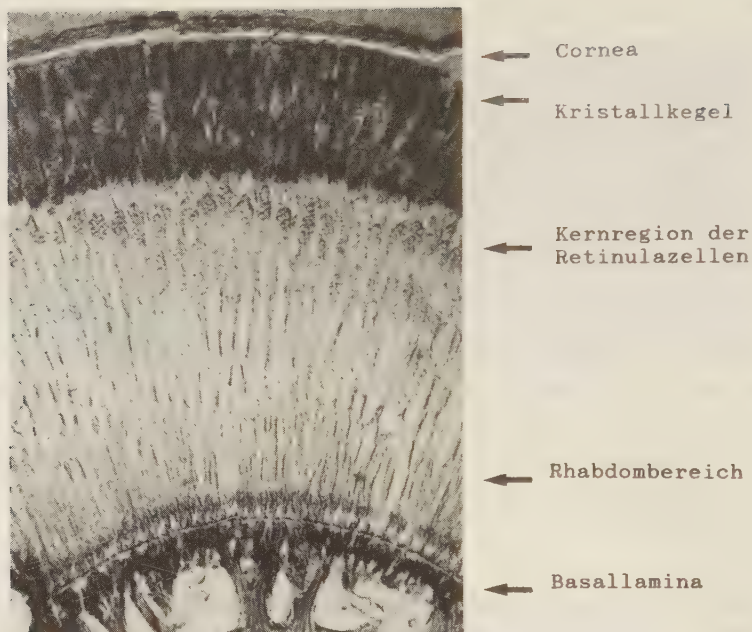


Abb. 3: Teil eines histologischen Schnittes durch das Auge von *S. littoralis*.

(Paraffineinbettung, Susa-Fixierung, Azan-Färbung, Schnittstärke: 38 μ m, Vergrößerung: 420 fach)

drei benachbarten Ommatidien. Die Stellung des Schirmpigmentes dieser Zellen ist vom Adaptationszustand des Auges abhängig (EXNER, 1891; HÖGLUND, 1966) (Abb. 4). Im dunkeladaptierten Zustand konzentrieren sich die Schirmpigmentgranula rund um den Kristallkegel. Mit steigender Lichtintensität wandern sie proximad entlang den Ausläufern der Retinulazellen und erreichen im Extremfall die Spitze des Rhabdoms. Dieser Übergang zum helladaptierten Zustand dauert nur etwa 1-2 Minuten. Er kann durch das langsame Verschwinden des für den dunkeladaptierten Zustand typischen "Augenglühens" beobachtet werden.

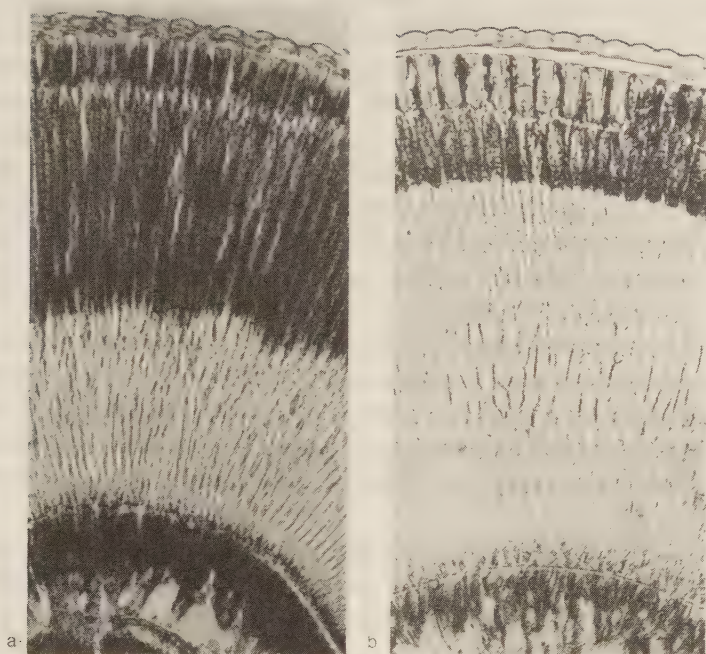


Abb. 4: Schirmpigmentstellung im Auge von *S. littoralis* in Abhängigkeit vom Adaptationszustand. a: helladaptiert b: dunkeladaptiert.

(ungefärbter Paraffinschnitt, Susa-Fixierung, Schnittdicke: 38 μm , Vergrößerung: 420 fach)

Die Sehfärbstoffe wurden bei *Spodoptera exempta* mikrospektral-photometrisch an Schnitten von frischem Retinagewebe, durch die Methode der selektiven Adaptation in situ und in Digitonin-Extrakten untersucht (LANGER et al., 1979). Die morphologische Lokalisation der unterschiedlichen Sehfärbstoffe in den einzelnen Rhabdomeren erfolgte durch elektronenmikroskopische Untersuchungen an Augen, die zuvor mit monochromatischem Licht bestrahlt wurden (LANGER et al., 1979; MEINECKE & LANGER, 1984; ANTON-ERXLEBEN & LANGER, 1987). Die Rhabdomere, die einen für die entsprechende Wellenlänge empfindlichen Sehfärbstoff enthielten, zeigten deutlich sichtbare Anschwellungen, wogegen alle anderen

Rhabdomere unbeeinflusst blieben. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, daß die distale Zelle des Rhabdoms für blaues oder UV-Licht empfindlich ist. Die Absorptionsmaxima der betreffenden Sehfärbstoffe liegen bei 355 nm für den UV-Rezeptor und 465 nm für den Blaurezeptor. Die sechs medialen Zellen enthalten einen Sehfärbstoff mit einer maximalen Empfindlichkeit für grünes Licht; das Absorptionsmaximum liegt bei 515 nm. Das Pigment der basalen Retinulazelle weist eine maximale Absorption bei 560 nm auf und ist noch für Licht im roten Spektralbereich empfindlich.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen von belichteten Augen der schirmpigmentarmen Mutante zeigten massive Veränderungen in der Feinstruktur der Retina mit großen Mengen an glattem Endoplasmatischem Retikulum und einer Vielzahl von multilamellären Körpern. Die Rhabdomstruktur ist unter diesen Bedingungen nahezu zerstört.

In der vorliegenden Arbeit soll zunächst, als Grundlage für die nachfolgenden Experimente, das Sehfärbstoff-System von S. litto-
ralis unter Normalbedingungen betrachtet werden. Für diese Untersuchungen werden Augen von Faltern benutzt, deren Raupen mit unterschiedlichen Futterpflanzen aufgezogen und unter natürlichen Lichtbedingungen gehalten wurden. Neben den Absorptionseigenschaften der verschiedenen Sehfärbstoffe, sowie der Ermittlung des Gesamtsehfärbstoffgehaltes, sollen das Molekulargewicht der Proteinkomponente (Opsin) und die Art des Chromophors bestimmt werden. Die Bedeutung unterschiedlicher Carotinoide als Vorstufen für den Aufbau der Sehfärbstoffe und eventuelle Unterschiede in der Wirksamkeit dieser Stoffe in verschiedenen Entwicklungsstadien der Versuchstiere sollen untersucht werden.

Im ersten Schritt soll anhand von Fütterungsversuchen der Einfluß unterschiedlicher Carotinoide auf die Sehfärbstoffsynthese getestet werden. Dies geschieht durch Zugabe einzelner Carotinoide zu einer nahezu Vitamin A-freien Diät, die an die Raupen verfüttert wird. Der Sehfärbstoffgehalt in den Augen der Imagines dient als Maß für die Wirksamkeit der betreffenden Substanz.

In einem zweiten Schritt soll durch Injektion verschiedener Caro-

tinoide in unterschiedliche Entwicklungsstadien (Raupe, Puppe, Imago) der Versuchstiere die Wirkung dieser Substanzen auf die Sehfarbstoffsynthese getestet werden. Bei Verwendung von Versuchstieren, die mit Vitamin A-arter Diät aufgezogen wurden, sollte ein nach Injektion erhöhter Sehfarbstoffgehalt ein Maß für die Wirksamkeit der injizierten Substanz sein. Mit dieser Methode ist es auch möglich, Substanzen zu untersuchen, die den Tieren nicht durch Fütterung verabreicht werden können. Durch direkte Injektion in die Komplexaugen von Imagines mit reduziertem Sehfarbstoffgehalt soll die Fähigkeit des Auges eines voll entwickelten, kurzlebigen Insekts zum Aufbau eines Rhabdoms getestet werden. Die Induktion der Proteinbiosynthese aufgrund der Injektion von Retinal soll durch das Entstehen radioaktiv markierter Proteine in der Retina nach vorausgegangener Injektion von Retinal und ^3H -markierten Aminosäuren untersucht werden.

Der Einfluß von Licht auf das Auge und dessen Sehfarbstoffgehalt wird zusätzlich zum Wildtyp an einer gelbäugigen Mutante von S. littoralis untersucht, die eine starke Reduktion der Schirmpigmente aufweist.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Für die Durchführung der Experimente zur vorliegenden Arbeit wurden Tiere der Spezies Spodoptera littoralis (Boisd.) (Lepidoptera, Noctuidae) verwendet. Die dunkeläugige Linie stammte aus Freilandfängen bzw. Laborzuchten in Ägypten. Die pigmentverarmte gelbäugige Mutante (DITTRICH & LUETKEMEIER, 1980) wurde von der Ciba-Geigy AG, Basel, zur Verfügung gestellt.

2.1.1. Aufzucht und Haltung

Die Imagines wurden in Plexiglas-Wannen (7-15 l) gehalten, die mit einem Deckel aus feinmaschigem Drahtgeflecht verschlossen waren. Zur Erhöhung der Luftfeuchtigkeit waren die Wannen 2-3 cm hoch mit angefeuchtetem Sägemehl gefüllt. Die Eier wurden von den Weibchen an die Wände der Gefäße oder auf ausgelegte Faltenfilter abgelegt. Die Eilarven wurden auf die Futterpflanzen gesetzt und in geschlossenen Gefäßen gehalten. Hierbei wurde besonders darauf geachtet, daß entstehendes Kondenswasser durch Filterpapier aufgesaugt wurde, um eine Schimmelbildung auf den Pflanzen möglichst zu vermeiden. Zur Belüftung der Gefäße waren diese mit feinen Löchern versehen. Nach Erreichen des dritten oder vierten Larvenstadiums wurden die Raupen in mit Sägemehl gefüllte Wannen überführt. Die Puppen wurden aus dem Sägemehl ausgesiebt und in andere Wannen umgesetzt.

Bei der Aufzucht der Raupen mit der halbsynthetischen Diät wurde in ähnlicher Weise verfahren. Aufgrund des positiv phototaktischen Verhaltens der frisch geschlüpften Eilarven war es möglich, die Raupen auf zum Licht hin orientierten Petrischalen aufzufangen, die mit der halbsynthetischen Diät gefüllt waren (2.1.2.). Die Petrischalen mit den Eilarven wurden mit einem Deckel verschlossen, unter dem ein Rundfilter eingeklemmt wurde, um entstehendes Kondenswasser aufzusaugen. Die Schalen mit der Diät wurden jeweils so aufgestellt, daß der Kot der Raupen auf die Unterlage und nicht auf die Nahrung fiel. Im zweiten oder

dritten Raupenstadium wurden die Raupen in große Plastikdosen (500 ml) und nach dem vierten Raupenstadium in Plexiglas-Wannen umgesetzt. Diese wurden ca. 5 cm hoch mit angefeuchtetem Sägemehl gefüllt, in das sich die verpuppungsreifen Raupen eingruben. Die Puppen wurden ebenfalls ausgesiebt und in andere Wannen überführt.

Die Temperatur in dem Zuchtraum betrug ca. 26 °C. Die Photoperiode entsprach dem jahreszeitlich bedingten Tag/Nacht-Rhythmus. Zur Erhöhung der Luftfeuchtigkeit in den Zuchtgefäßen mit den Imagines wurden diese regelmäßig mit Wasser bespritzt. Zusätzlich wurden auf die Drahtdeckel feuchte Filterpapiere aufgelegt, die den Faltern auch als Flüssigkeitsquelle dienten.

Unter den angegebenen Bedingungen ergaben sich folgende Zeiten für den Entwicklungszyklus einer Generation: Die Lebensdauer der Falter betrug 8-10 Tage. Nach 2-3 Tagen wurden die ersten Eier abgelegt. 4-5 Tage danach schlüpften die ersten Eilarven. Die Entwicklung der Raupen von der Eilarve bis zur verpuppungsreifen Raupe dauerte ca. 10 Tage. Nach etwa 10 weiteren Tagen schlüpften die ersten Falter aus den Puppen. Insgesamt ergab sich eine durchschnittliche Generationsdauer von ungefähr einem Monat.

2.1.2. Futter

2.1.2.1. Naturfutter

Zur Aufzucht unter naturnahen Bedingungen wurden die Raupen mit unterschiedlichen Pflanzen gefüttert, und zwar mit folgenden Arten: Rizinus (*Rizinus communis*), Tomate (*Lycopersicum esculentum*), Löwenzahn (*Taraxacum spec.*) und Weizen (*Triticum spec.*). Mit Ausnahme des Löwenzahns, der in den Freianlagen des Universitätsgeländes gesammelt wurde, stammten alle Pflanzen aus den Gewächshäusern der Universität. Für die Anzucht kam nur unbehandeltes Saatgut zur Verwendung, und die Pflanzen wurden nicht mit Pflanzenschutzmitteln gespritzt.

2.1.2.2. Halbsynthetische Diät

Die nachfolgend beschriebene halbsynthetische carotinoidarme Diät (modifiziert nach WYNIGER, 1974) diente als Futter für die Erhaltungszuchten und als Grundkomponente für die Fütterungsversuche mit angereicherten Diäten.

Zusammensetzung der Diät:

Wasser	2100,0	ml
KOH (22,5%)	10,8	ml
Casein (alkalilöslich)	75,6	g
Glucose	37,8	g
Weizenkeime	64,8	g
Wesson's Salz	21,6	g
Natrium-Alginat	7,2	g
Agar	54,0	g
Formaldehyd (38%)	1,8	ml
Cholinchlorid (10%)	21,6	ml
Vitamin-Lösung	3,6	ml
Tocopherol	0,17	g
Ascorbinsäure	8,4	g
Aureomycin	0,56	g
Nipagin	4,4	g

Die fertige Diät wurde in Petrischalen gegossen und bei -20 °C gelagert.

2.1.2.3. Diät mit Zusatzstoffen

Die für die Fütterungsexperimente benötigten Diäten mit Zusatzstoffen wurden folgendermaßen hergestellt: eine definierte Menge der zu testenden Carotinoide wurde in einem minimalen Volumen Aceton gelöst und der warmen Diät zugemischt. Anschließend wurde deren Gewicht bestimmt und die genaue Konzentration der Zusatzstoffe in der Diät berechnet. Die Lagerung erfolgte ebenfalls bei -20 °C.

Um eine Zersetzung oder Veränderung der Carotinoide durch Wärme, Luftsauerstoff oder andere Einflüsse zu vermeiden, wurde jeweils nur so viel Diät in die Zuchtgefäße gegeben, wie die Raupen in wenigen Stunden fressen konnten.

Die Haltbarkeit der zugesetzten Carotinoide und deren eventuelle Veränderung durch in der Diät enthaltene Substanzen wurde anhand von Acetonextrakten aus den Diäten untersucht. Anhand der Absorptionsspektren konnten dabei auch nach längerer Lagerung (bis zu einem Jahr bei -20°C) keine Veränderungen gegenüber der frischen Diät festgestellt werden. Damit kann ein Einfluß auf die Versuchsergebnisse aufgrund von Veränderungen der Zusatzstoffe durch die Lagerung ausgeschlossen werden.

2.2. Injektion

2.2.1. Apparatur und Geräte

Die Apparatur für die Injektionen bestand aus einer Mikroliter-spritze (UNIMETRICS 5005 R), die über einen Mikrovorschub (UNIMETRICS Dual Range Repeating Dispenser) betrieben wurde. Die für die Injektionen benötigten Glaskapillaren wurden mit einem Kapillarenziehgerät angefertigt. Die Kapillaren wurden in die Halterung eines Mikromanipulators (LEITZ) eingesetzt und über einen dünnen Teflon- bzw. Gummischlauch mit der Mikroliterspritze verbunden.

2.2.2. Durchführung der Injektionen

2.2.2.1. Injektionen in die Augen der Imagines

Zur Durchführung der Injektionen wurde die oben beschriebene Apparatur luftblasenfrei mit Wasser gefüllt, um den Kolbenhub der Mikroliterspritze auf die Kapillare zu übertragen. Die in Heptan gelösten Stoffe konnten direkt über die Kapillarenspitze aufgezogen werden, ohne daß eine Vermischung mit dem Wasser erfolgte. Für die Injektion in DMSO gelöster Stoffe wurden zunächst einige Mikroliter Heptan aufgezogen, um auch hier eine Vermischung der Probensubstanzen mit dem Wasser auszuschließen. Das Mikrodosiergerät gab je nach Einstellung jeweils $1/25$ oder $1/50$ des Spitzeninhaltes frei ($0,2\text{ }\mu\text{l}$ bzw. $0,1\text{ }\mu\text{l}$).

Die Versuchstiere wurden für die Injektionen mittels gekreuzter

Insektennadeln zwischen Kopf und Thorax bzw. über dem Abdomen auf einem Styroporblock fixiert. Um das Eindringen der Glaskapillare in das Auge zu ermöglichen, wurde mit einer Insektennadel ein feines Loch in die Cornea gebohrt, in das mit Hilfe des Mikromanipulators die Kapillare eingeführt wurde. Der Einstich erfolgte am Augenrand, um ein Eindringen der Cornea zu vermeiden. Die Kapillare wurde so eingestochen, daß deren Spitze in der "clear zone" des Superpositionsauges zwischen Cornea und Retina lag (Abb. 3).

2.2.2.2. Injektion von Farbstoffen in die Augen

Um die Verteilung von in das Auge injizierten Stoffen kennenzulernen, wurden verschiedene Farbstofflösungen injiziert. Bei der schirmpigmentarmen Mutante konnten der Injektionsverlauf und die Ausbreitung des Farbstoffes direkt beobachtet werden. Die Verteilung und der Verbleib dieser Stoffe Stunden oder Tage nach der Injektion wurden anhand von Kryotomschnitten verfolgt. Dazu wurden die Köpfe der Falter bei -20°C auf Objekthalter aufgefroren und auf einem Gefriermikrotom (PEARSE "HS") geschnitten. Die Schichtdicke betrug $38\text{ }\mu\text{m}$. Die Schnitte wurden bei -20°C gefriergetrocknet und mit Eukitt eingebettet. Die Auswertung der Präparate erfolgte im Licht- oder Fluoreszenzmikroskop.

2.2.2.3. Injektionen in die Hämolymphe der Imagines

Für die Injektionen in die Hämolymphe der Imagines wurden diese auf die Dorsalseite gelegt. Eine Glaskapillare wurde dann mit Hilfe des Mikromanipulators flach in die ventralen Intersegmentalhäute eingestochen. Das Injektionsvolumen betrug $1\text{ }\mu\text{l}$.

2.2.2.4. Injektionen in die Raupen

Die Raupen wurden für die Injektionen auf die Dorsalseite gedreht. Die Injektion erfolgte in die Basis eines der hinteren Ab-

dominalfüßchen. Um einen zu großen Verlust an Hämolymphe durch Bewegungen der Raupen zu vermeiden, wurden diese vor und nach der Injektion für einige Minuten in einem gekühlten Gefäß gehalten. Von der zu testenden Substanz wurden jeweils 2-4 µl einer 28 mM Lösung injiziert.

2.2.2.5. Injektionen in die Puppen

Die Injektionen in die Puppen wurden am Augenrand der durch die Puppenhülle sichtbaren Augenregion durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde die Puppenhülle an der betreffenden Stelle mit einer feinen Insektennadel durchstoßen, und durch dieses Loch die Glaskapillare eingeführt. Das Injektionsvolumen betrug 0,2 µl.

2.2.3. Für die Injektionen verwendete Stoffe

Als Lösungsmittel dienten entweder Heptan (BAKER) oder DMSO (RIEDEL-DE HAEN). All-trans Retinal (SERVA) wurde in einer 28 mmolaren Heptan-Lösung eingesetzt. All-trans 3-Hydroxyretinal* wurde in einer 28 mmolaren DMSO-Lösung verwendet. β-Carotin (SIGMA), Zeaxanthin* und Vitamin A (SIGMA) wurden in 14 bzw 28 mmolaren Lösungen eingesetzt.

*Diese Substanzen wurden freundlicherweise von der Firma HOFFMANN-LA ROCHE zur Verfügung gestellt.

2.2.4. Herstellung der Retinal-Isomere

Die bei den Injektionen benutzten Retinal-Isomere wurden wie folgt hergestellt: Eine ungefähr 1%ige Lösung des all-trans Retinals oder all-trans 3-Hydroxyretinals wurde im Kühlraum mit einer 100 W Glühlampe bestrahlt. Zur Vermeidung von Oxidationsprozessen durch Luftsauerstoff wurde die Lösung mit Stickstoff überschichtet und während der Bestrahlung (ca. 60 Minuten) auf einem Magnetrührer ständig gerührt. (HUBBARD et al., 1971)

Nach der Bestrahlung wurde das Lösungsmittel mit einem schwachen Stickstoffstrom abgedampft und das zurückbleibende Retinal bei -20°C gelagert. Zur Injektion wurde aus diesem eine Lösung mit definierter Konzentration in einem geeigneten Lösungsmittel hergestellt.

2.2.5. Hälterung der Tiere nach den Injektionen

Nach den Injektionen wurden die Versuchstiere je nach Anforderung entweder im Dauerdunkel (DD) oder bei normalem Tag/Nacht-Rhythmus (LD) gehalten. Die Gefäße waren 1-2 cm hoch mit feuchtem Sägemehl gefüllt, um die Luftfeuchtigkeit zu erhöhen. Die Umgebungstemperatur betrug 26°C .

2.3. Präparation und Reinigung der Retinae

Vor Entnahme der Retinae wurden die Falter mindestens 20 Minuten dunkeladaptiert. Anschließend wurde der Kopf vom Thorax abgetrennt und nach dem Entfernen von Antennen und Rüssel die Cornea mit einem Rasierklingsplitter angeschnitten und abgehoben. Der dioptrische Apparat und große Teile des bei dunkeladaptierten Tieren proximad gewanderten Schirmpigmentes (Abb. 4b) konnten auf diese Weise entfernt werden. Die so freipräparierten Retinae wurden entnommen, von anhaftendem Nervengewebe gelöst und in gekühlten Phosphatpuffer (pH 8,2) überführt.

Anschließend erfolgte entweder die sofortige Reinigung und Aufarbeitung der Retinae, oder diese wurden in dem Puffer in lichtundurchlässigen Dosen bei ca. -20°C eingefroren.

Zur Reinigung wurden die Retinae jeweils 2 Stunden in Phosphatpuffer der pH-Stufen 8,2 und 6,5 (SÖRENSEN, 1909) und in destilliertem Wasser geschüttelt (EPENDORF Rotationsmischer 3300). Zwischen den einzelnen Waschgängen wurden die Retinae ca. 10 Minuten zentrifugiert (EPENDORF Tischzentrifuge 3200, 10.000g). Bei starker Färbung des Überstandes durch Schirmpigment wurde der

Waschgang mit dem entsprechenden Puffer wiederholt. Die gewaschenen Retinae wurden bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren.

Alle Schritte der Präparation und Reinigung erfolgten in schwachem Rotlicht (rote Dunkelkammerglühbirne, PHILIPS).

2.4. Extraktion

2.4.1. Extraktion der Sehfärbstoffe

Zur quantitativen Bestimmung des Sehfärbstoffgehaltes der Retinae mußte der Waschpuffer vollständig von den Retinae entfernt werden. Zu diesem Zweck wurde der verbliebene Puffer mit saugfähigem Papier abgesaugt. Anschließend wurden pro eingesetzter Retina $3\text{ }\mu\text{l}$ 3% Digitonin-Lösung (MERCK) in Puffer (pH6,5) zugegeben, das Sediment aufgerührt und über Nacht (ca. 16 Stunden) im Kühlraum stehen gelassen. Im Anschluß an die Extraktion wurden die Proben zentrifugiert und die Überstände entweder sofort gemessen oder bei -20°C eingefroren. Für Extrakte von Naturfutter-Tieren wurden i.a. 6 Retinae eingesetzt und bei den Diät-Tieren wurden 10 Retinae verwendet.

2.4.2. Extraktion der Carotinoide

2.4.2.1. Extraktion aus der Nahrung und aus den Faeces

Für die Bestimmung des Carotinoidgehaltes der Nahrung bzw. der Faeces wurden im allgemeinen Aceton-Extrakte verwendet. Zu diesem Zweck wurde eine definierte Menge des Materials mehrmals mit 1 ml Aceton extrahiert bis der Überstand farblos war. Die Extrakte wurden vereinigt und zentrifugiert bis sie keine Trübung mehr aufwiesen. Die Überstände wurden mit Stickstoff eingengt und in einem geeigneten Lösungsmittel (Ethanol, Hexan) resuspendiert. Im Anschluß daran wurden von diesen Lösungen Extinktionsspektren aufgenommen.

2.4.2.2. Extraktion aus der Hämolymphe der Raupen

2.4.2.2.1. Gewinnung der Hämolymphe

Vor Gewinnung der Hämolymphe wurden die Raupen ca. 20 Minuten bei 4 °C im Kühlraum gehalten. Dann wurden ihnen durch einen kleinen Schnitt in einen der Afterfüße zwei bis drei Tropfen Hämolymphe entnommen und in ein trockenes gekühltes Gefäß überführt. Die Raupen blieben danach einige Minuten in einer eisgekühlten Schale und wurden dann in die Zuchtgefäße zurückgesetzt.

2.4.2.2.2. Extraktion aus der Hämolymphe

Die Hämolymphe wurde zentrifugiert; von dem Überstand wurde ein Extinktionsspektrum aufgenommen. 500 µl des Überstandes und das Sediment wurden mit jeweils 500 µl Dichlormethan/Ethanol (1+1) versetzt und ca. 15 Minuten im Eisbad stehen gelassen. Daran schloß sich eine dreiminütige Extraktion in einem Ultraschallbad (SONOREX TK 52) an. Nach der anschließenden Zentrifugation wurde die organische Hypophase abgesaugt und davon ein Extinktionsspektrum aufgenommen.

2.5. Photometrie

2.5.1. Bestimmung des Sehfärbstoffgehaltes

Die photometrische Bestimmung des Sehfärbstoffgehaltes erfolgte in einem Zweistrahlspektralphotometer (Uvicon 810, KONTRON INSTRUMENTS). Die Küvetten (HELLMA, Quarz, d=1cm) wurden mit 20 µl Extrakt gefüllt und dieser gegen destilliertes Wasser als Referenz gemessen. Die Küvettenhalter konnten über einen Thermostaten auf ungefähr 5 °C gekühlt werden.

Zunächst wurde ein Absorptionsspektrum der Proben in dem Wellenlängenbereich von 700 nm bis 300 nm aufgenommen und als Basis gespeichert. Zur Aufzeichnung einer Basislinie wurde von dem unbelichteten Extrakt nochmals ein Absorptionsspektrum aufgenommen und dieses durch einen in das Photometer integrierten Basislini-

enkorrekter automatisch von der gespeicherten Basis subtrahiert und das Differenzspektrum über den angeschlossenen Schreiber (Uvikon Recorder 21, KONTRON INSTRUMENTS) ausgegeben. In gleicher Weise wurden von den Extrakten nach jeder Belichtung Spektren aufgenommen und die sich daraus ergebenden Differenzspektren aufgezeichnet.

Die Bestrahlung der Extrakte zur Bleichung der Sehfärbstoffe erfolgte mittels einer Richtleuchte (SPINDLER & HOYER) mit einer 100 W Halogenprojektionslampe (OSRAM) und vorgesetzten Linienfiltern (SCHOTT) zur Erzeugung von monochromatischem Licht. Die Bestrahlung der Extrakte wurde fortgesetzt, bis keine Extinktionsänderungen in den Differenzspektren mehr erkennbar waren.

Für die Ermittlung des Sehfärbstoffgehaltes in den Retinae wurde mit einem molaren Absorptionskoeffizienten von $\epsilon=40.000 \text{ (} 10^3 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1} \text{)}$ gerechnet.

2.5.2. Photometrische Bestimmung des Carotinoidgehaltes

Für die Bestimmung des Carotinoidgehaltes in Nahrung, Faeces und Hämolymphe wurde folgende Formel verwendet:

$$x = \frac{E \cdot y}{E \cdot \epsilon_m \cdot 100}$$

Dabei ist x die Menge an Carotinoiden (g); y das Volumen des Extraktes (ml); E die gemessene Extinktion im Absorptionsmaximum; $E \cdot \epsilon_m$ eine für jedes Carotinoid spezifische Konstante ($100 \text{ cm}^3/\text{g}$). Wenn diese Konstante nicht bekannt ist, kann als guter Näherungswert 2500 eingesetzt werden (BRITTON, 1985).

2.6. Gelelektrophorese

Die Elektrophoresen wurden als Vertikalelektrophoresen auf Gradientengelen mit Sammelgel durchgeführt (HENNING, 1986). Als Aus-

gangsmaterial für die Proteintrennung wurden entweder ganze, gereinigte Retinae oder bereits photometrisch gemessene Digitonin-Extrakte verwendet. Die Apparatur bestand aus einer Elektrophoresekammer aus Plexiglas, sowie einem Stromversorgungs-
 (BECKMANN Duostat). Die Elektrophoresen wurden, wenn nicht anders angegeben, in einem Kühlraum bei 4 °C durchgeführt.

2.6.1. Probenvorbereitung

Zur Auftrennung der Proteine aus ganzen Retinae, wurden diese wie unter (2.3.) angegeben präpariert und gereinigt. Anschließend wurden die Retinae über Nacht bei 30 °C mit einem SDS-Extraktionsgemisch (Zusammensetzung s.u.) inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und aufbewahrt. Für die Extraktion wurden pro Retina 3-5 µl Extraktionsgemisch zugegeben, mindestens jedoch 31 µl, um genügend Extrakt für die Proteinbestimmung zur Verfügung zu haben.

Zur Auftrennung der Proteine aus Digitonin-Extrakten mußten diese über Nacht bei 4 °C mit 5 µl Extraktionspuffer pro 20 µl Extrakt inkubiert werden, um eine saubere Trennung der Banden auf dem Gel zu erreichen.

Extraktionsgemisch:	SDS-Extraktionspuffer	1 Teil
	Tris-HCl-Puffer (pH8,8; 0,05M)	5 Teile
Extraktionspuffer:	SDS (25%)	450,0 µl
	Aqua bidest.	50,0 µl
	DTE	0,01 g
	DTT	0,005 g

Zur Analyse der Hämolymphe wurde diese zunächst zentrifugiert (10 min, 10.000 g). Der Überstand wurde abgenommen, mit kaltem Aceton gefällt und anschließend ebenfalls zentrifugiert. Die beiden Sedimente wurden sodann mit SDS-Extraktionsgemisch über Nacht bei 30 °C extrahiert. Im Anschluß an die Proteinbestimmung wurden jeweils 20 µg Protein auf das Gel aufgetragen.

2.6.2. Proteinbestimmung

Um auf ein Gel gleiche Proteinmengen auftragen zu können, mußte

die Proteinkonzentration bekannt sein. Deshalb wurde jeweils eine Proteinbestimmung durchgeführt. Hierzu wurden 5 µl des obigen Extraktes auf ein Celluloseacetat- Plättchen aufgetragen und mit Stickstoff getrocknet. Dann wurde 1 ml Färbelösung zugegeben und 10 Minuten inkubiert, danach die Färbelösung abgegossen und so lange mit Aqua bidest. gespült, bis keine Färbung des Waschwassers mehr auftrat. Anschließend wurden die Plättchen 15 Minuten lang in Entfärbelösung gegeben, danach Plättchen in trockene Röhrchen überführt und in 1,5 ml Eluierlösung vollständig aufgelöst. Die Messung der Proben erfolgte in einem Photometer (EPPENDORF) bei 623 nm. Der Proteingehalt der Proben wurde aus einer mit Albumin erstellten Eichgerade ermittelt.

Zusammensetzung der verwendeten Lösungen:

Färbelösung:	Amidoschwarz	0,24	g
	Methanol	45,0	ml
	Aqua bidest.	45,0	ml
	Essigsäure konz.	10,0	ml

Entfärbelösung: Gleiche Zusammensetzung wie Färbelösung, jedoch ohne Amido-Schwarz.

Eluierlösung:	Essigsäure konz.	80,0	ml
	Ameisensäure	10,0	ml
	Aqua bidest.	10,0	ml
	Trichloressigsäure	1,0	g

2.6.3. Zusammensetzung des Gels

Zur Herstellung der Trenn- und Sammelgele (0,9 mm) wurden folgende Komponenten gemischt:

Trenngel:	6%	20%
Harnstoff	1,28 g	1,62 g
Acrylamid/Bisacrylamid	0,8 ml	3,4 ml
2M Tris-HCl (pH 8,8)	1,3 ml	1,7 ml
70% Saccharose	-,--	1,4 ml
Aqua bidest.	3,5 ml	0,7 ml
SDS (20%)	17,0 µl	21,0 µl
Temed	3,3 µl	4,4 µl
Ammoniumpersulfat	17,0 µl	21,0 µl

Sammelgel:

Harnstoff	1,9	g
Acrylamid/Bisacrylamid	1,0	ml
0,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,4	ml
70% Saccharose	3,9	ml
Aqua bidest.	1,0	ml
SDS (20%)	45,0	µl

Temed	10,0	µl
Ammoniumpersulfat	25,0	µl

Die polymerisierten Gele konnten in Elektrodenpuffer über Nacht bei 4 °C aufbewahrt werden.

Zusammensetzung des Elektrodenpuffers:

Tris-HCl	3,0	g
Glycin	14,4	g
SDS	1,0	g
Harnstoff	18,0	g
Mercaptoethanol	2,0	ml

Die Substanzen wurden mit Aqua bidest. auf einen Liter aufgefüllt.

2.6.4. Auftragen der Proben

Auf ein Gel wurden pro Tasche jeweils gleiche Probenvolumina aufgetragen. Die Proben setzten sich wie folgt zusammen: 5 µl Bromphenolblau, 1 µl Mercaptoethanol, ein Aliquot Extrakt, in dem 20 µg Protein enthalten waren (jedoch maximal 25 µl) sowie eine variable Menge Extraktionsgemisch, um das Probenvolumen auf 31 µl aufzufüllen. Die äußerst rechte und linke Tasche wurde zur Vermeidung von Randeffekten bei der Proteintrennung ohne Probe belassen.

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes der aufgetrennten Proteine wurde mindestens eine Tasche des Gels mit einem Markergemisch aus Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht beladen. Dazu wurde eine Stammlösung des Markergemisches angesetzt, in der jeweils 1 mg des Proteins in 10 ml Tris-HCl-Puffer (0,05 M, pH 8,8) gelöst waren. Die Stammlösung wurde im Gefrierschrank aufbewahrt.

Zusammensetzung des Markergemisches:

Cytochrom C	MG 12.500
Trypsininhibitor (Sojabohne)	MG 22.000
Ovalbumin (Huhn)	MG 45.000
Serumalbumin (Rind)	MG 69.000

2.6.5. Elektrophorese

Zunächst wurde durch das leere Gel ca. 20 Minuten lang ein Strom von 5 mA geschickt. Dann wurden die Proben aufgetragen und anschließend bei 15 mA so lange gewartet, bis die Proben in das Sammelgel gewandert waren. Dann wurde der Strom auf 25-30 mA erhöht. Die Dauer der Elektrophorese betrug unter diesen Bedingungen etwa $2\frac{1}{2}$ Stunden.

2.6.6. Behandlung der fertigen Gele

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel in eine Fixierlösung aus 10% Essigsäure und 30% Ethanol überführt und mindestens eine Stunde fixiert.

Zur Anfärbung der Proteinbanden auf dem Gel wurde dieses über Nacht in eine Färbelösung gelegt. Die Färbelösung war wie folgt zusammengesetzt:

Coomassie Blue G-250	0,25	g
Ethanol	45,0	ml
Essigsäure	45,0	ml
Aqua bidest.	10,0	ml

Die Lösung wurde bei Bedarf vor dem Gebrauch filtriert und war mehrmals zu verwenden.

Zur Sichtbarmachung der gefärbten Proteinbanden wurde das Gel nach Abschluß des Färbevorganges in eine Entfärbelösung überführt (30% Ethanol, 6% Essigsäure in Aqua bidest.). Bei stark gefärbten Gelen mußte die Entfärbelösung mehrmals gewechselt werden, um ei-

nen farblosen Untergrund zu erreichen. Anschließend wurden die Gele zur Dokumentation fotografiert und dann in 6% Essigsäure aufbewahrt.

Für bereits fixierte und mit Coomassie-Blau gefärbte Gele wurde zur Sichtbarmachung schwacher Proteinbanden eine Silberfärbung nach HEUKESHOVEN & DERNICK angewandt. Die Färbung verlief nach folgendem Schema :

waschen	10% Ethanol	2x 10'
waschen	Aqua bidest.	3x 10'
färben	0,1% AgNO ₃	1x 30'
waschen	Leitungswasser	1x 10''
entwickeln	3% Na ₂ CO ₃	1x 10'
stoppen	1% Essigsäure	1x 10'
waschen	Aqua bidest.	3x 15'

War die Färbung nicht ausreichend, wurde der Zyklus wiederholt, bis das gewünschte Ergebnis erzielt wurde. Bei einem Überfärben des Gels wurde dieses mit Farmer'schem Abschwächer behandelt, und wie folgt entfärbt:

Abschwächer nach Farmer ¹	10-30''
waschen mit Aqua bidest.	3x 15'

¹ 0,3% Na₂S₂O₃ , 0,15% K₃(Fe(CN)₆ in Aqua bidest.

Die fertig gefärbten Gele wurden in Aqua bidest. bei 4 °C aufbewahrt.

Glykoproteine konnten in den Gelen selektiv angefärbt werden. Für den Färbevorgang wurden folgende Lösungen benötigt:

1. 12,5 % Trichloressigsäure
2. 1% Perjodsäure in 3% Essigsäure
3. 0,1 n AgNO₃
4. Schiff'sches Reagenz (MERCK)
5. 0,5 % Natriumdisulfit

Die Anfärbung erfolgte nach folgendem Verlaufsschema:

fixieren	Lösung 1	1x 30'
waschen	Aqua Bidest	1x 30''
inkubieren	Lösung 2	1x 50'
waschen*	Aqua bidest.	6x 10'
inkubieren**	Lösung 4 (100 ml)	1x 50'
schütteln**	Lösung 5 (100 ml)	3x 10'
waschen	Aqua bidest. bis überschüssiger Farbstoff entfernt ist	

* Nach jedem Waschgang mit Lösung 3 auf JO⁻³ testen. Wenn der Test negativ ausfällt, kann weitergearbeitet werden.

**** Diese Schritte müssen bei schwachem Rotlicht durchgeführt werden.**

2.6.7. Reduktion des Sehfarbstoffes mit Dimethylamin-Boran

Die Reduktion des Sehfarbstoffes erfolgte nach folgender Vorschrift: Die gewaschenen Retinae wurden in 1 ml Phosphat-Puffer (pH 6,5) suspendiert und mit 50 µl 2 n HCl versetzt. Nach 15 Minuten Inkubation bei 0 °C wurden 20 mg Dimethylamin-Boran (FLUKA) zugegeben. Die Lösung wurde dann 60 Minuten bei 20 °C stehen gelassen. Daran schloß sich eine 15 minütige Zentrifugation an. Das Sediment wurde danach 2x mit Puffer gewaschen. Die Extraktion mit SDS-Extraktionsgemisch erfolgte 2 Stunden bei 30 °C. Die anschließende Elektrophorese wurde in der oben beschriebenen Weise durchgeführt (Geldicke 1,8 mm). Alle Schritte der Aufarbeitung und Elektrophorese erfolgten bei schwachem Rotlicht.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel im UV-Licht bei 366 nm betrachtet. Die Banden mit dem Rhodopsin fluoreszierten mit einer bläulichen Farbe.

2.6.8. Photometrische Auswertung der Gele

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes des Opsins wurden die Gele in die einzelnen Spuren zerschnitten und in einem Photometer mit Gelscaneinrichtung (EPPENDORF-Photometer) bei einer Wellenlänge von 623 nm gescannt und aufgezeichnet (EPPENDORF Kompensations-schreiber 4410). Anschließend wurden die Wanderungsstrecken der Proteine im Gel ausgemessen. Aus den Daten der Marker wurde eine Eichgerade erstellt, aus der das Molekulargewicht des Opsins ermittelt wurde.

2.7. Autoradiographie

2.7.1. Injektion markierter Aminosäuren

Für die Autoradiographie wurde eine Lösung Tritium-markierter Aminosäuren mit einer spezifischen Aktivität von 37 MBq/ml (AMERSHAM TRK 550) benutzt. Vor der Injektion in die Augen der Versuchstiere wurde die Lösung mit einem schwachen Stickstoffstrom auf 1/10 des Ausgangsvolumens eingeeengt. Die Injektionen erfolgten wie unter 2.2.2.1. angegeben. Eine Stunde vor der Injektion der markierten Aminosäuren wurden die Retinale in die Augen injiziert.

2.7.2. Elektrophorese

Die Elektrophorese wurde wie unter 2.6. beschrieben durchgeführt. Die Temperatur während der Elektrophorese betrug jedoch 20 °C.

Zur Verkürzung der Expositionszeiten wurde das gefärbte Gel mit einem Enhancer (EN³HANCE, NEW ENGLAND NUCLEAR) imprägniert. Hierfür wurde das fixierte und gefärbte Gel eine Stunde lang in dem Enhancer vorsichtig geschüttelt. Danach wurde das Gel zur Präzipitatbildung 30 Minuten in dest. Wasser vorsichtig geschüttelt, bis das Gel einheitlich opak erschien. Danach wurde es auf einem Geltrockner (Eigenbau) getrocknet. Dazu wurde das Gel glatt auf ein Stück festes Filterpapier gelegt, erwärmt und im Vakuum vollständig getrocknet.

2.7.3. Exposition und Entwicklung der Autoradiogramme

Auf das getrocknete Gel wurde in der Dunkelkammer ein Röntgenfilm aufgelegt (KODAK X-OMAT AR). Das Sandwich aus Gel und Film wurde in eine lichtundurchlässige Kassette gelegt und bei -70 °C exponiert. Die Expositionsdauer betrug ca. 4 Wochen.

Nach Beendigung der Exposition wurde der aufgelegte Röntgenfilm 20 Minuten lang entwickelt (G 170 C, AGFA GEVAERT) und anschlie-

ßend fixiert (TETENAL Fixiersalz).

2.8. Dünnschichtchromatographie (HPTLC)

2.8.1. Apparatur

Die chromatographische Trennung der Proben erfolgte auf Hochleistungs-Dünnschichtplatten (Kieselgel 60 F₂₅₄, 10x10 cm mit Konzentrierungszone, MERCK). Die Trennung wurde in einem Chromatographietank aus Glas durchgeführt. Zur Sättigung der Kammer mit dem Fließmittel waren die Wände des Tanks mit Filterpapier ausgekleidet.

2.8.2. Aufarbeiten der Proben

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung und Trennung des Chromophors dienten frische oder gefriergetrocknete Retinae oder Digitonin-Extrakte.

2.8.2.1. Extraktion aus Retinae

Die frischen Retinae wurden vor der Extraktion zur Entfernung des Schirmpigments gewaschen (s. 2.3.), und der Puffer wurde vollständig abgesaugt. Zur Extraktion des Chromophors wurden die Retinae mit Methanol oder Aceton versetzt (2 µl/Retina) und anschließend 5 Minuten im Ultraschallbad (Sonorex TK 52, BANDELIN) extrahiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und im Eisbad aufbewahrt. Dann erfolgte eine zweite Extraktion. Das Lösungsmittel der vereinigten Überstände wurde mit einem Stickstoffstrom abgedampft. Zur Auftragung auf die Dünnschichtplatten wurden die Proben in Ethanol gelöst.

2.8.2.2. Extraktion aus Digitonin-Extrakten

Zu den Digitonin-Extrakten wurde SDS bis zu einer Endkonzentration von 1% zugegeben und bei Raumtemperatur 10 Minuten inkubiert.

Dann wurde das gleiche Volumen wie das der Probe an eiskalter Dichlormethan/Methanol-Mischung (1:1) zugegeben. Das Gemisch wurde dann einige Minuten im Eisbad inkubiert. Daran anschließend wurden die Proben 2 Minuten im gekühlten Ultraschallbad extrahiert. Nach Zentrifugation wurde die organische Hypophase abgesaugt und im Eisbad aufbewahrt. Dann erfolgte eine zweite Extraktion. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit einem Stickstoffstrom eingengt und zur Auftragung auf die Dünnschichtplatten in Ethanol resuspendiert (modifiziert nach PEPE & SCHWEMER, 1987).

2.8.3. Auftragen der Proben

Die Proben wurden mit Hilfe einer Mikroliterspritze (HAMILTON) auf die Dünnschichtplatten aufgetragen. Das Lösungsmittel, in dem die Proben gelöst waren, wurde dabei kontinuierlich mit einem schwachen Stickstoffstrom abgedampft, um möglichst kleine Probenflecken auf der Platte zu erreichen.

2.8.4. Chromatographie

Als Fließmittel für die Trennung wurde ein Gemisch aus Diethylether und Ethylacetat (14+6 ml) verwendet. Die Laufzeit zur Trennung der Proben betrug ca. 12 Minuten.

Alle Schritte von der Aufarbeitung der Proben bis zur chromatographischen Trennung erfolgten in schwachem Rotlicht, um eine Isomerisierung der Proben durch Licht möglichst zu vermeiden.

2.8.5. Anfärben der Chromatogramme

Nach Beendigung der chromatographischen Trennung wurden die Platten zunächst unter einer UV-Lampe (DESAGA Uvis, Heidelberg) betrachtet (254/366 nm). Die dabei sichtbar werdenden Probenflecken wurden fotografiert oder mit einem weichen Bleistift gekennzeichnet. Im Anschluß daran wurden die Platten mit einer frisch

gesättigten Lösung von Antimontrichlorid in Chloroform besprüht und dann sofort fotografiert (Abb. 7), oder die Probenflecken wurden ebenfalls mit einem Bleistift markiert.

Die Färbung bleichte innerhalb weniger Minuten fast vollständig aus, so daß eine dauerhafte Dokumentation der Probenflecken so nicht möglich war. Um eine über mehrere Wochen sichtbare Anfärbung zu erhalten, wurden die mit Antimontrichlorid behandelten Chromatogramme mit einer Lösung von 3% Vanillin (w/v) in Ethanol mit 1% Schwefelsäure (v/v) (modifiziert nach BRUENING, 1986) besprüht. Eine 60 minütige Erwärmung der Platten im Trockenschrank bei 70 °C verstärkte die Färbung noch gegenüber derjenigen nach Inkubation bei Raumtemperatur (Abb. 7b).

2.9. Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

2.9.1. Apparatur

Die Analysen wurden mit einer Anlage aus folgenden Komponenten durchgeführt: LKB HPLC-Pumpe 2150, LKB-Contoller 2152, WATERS Lambda-Max 461 LC-Spektrophotometer, sowie einer MERCK Hibar-Säule Lichrosorb SI 60. Die Probenaufgabe erfolgte manuell mit einer Mikroliterspritze über einen Injektor (LKB 2154) mit einer 20 µl-Probenschleife.

Die Aufzeichnung und Auswertung der Trennungen erfolgte mit Hilfe eines auf einem Personal-Computer installierten Softwarepakets (MAXIMA 820 Peak-Integration Program). Wahlweise konnten die Chromatogramme zusätzlich mit einem Schreiber (LKB 2210) aufgezeichnet werden.

2.9.2. Aufarbeitung der Proben

Die Extraktion des Chromophors erfolgte im allgemeinen aus Digitonin-Extrakten (2.8.2.2.). Es wurden sowohl gebleichte als auch ungebleichte Extrakte verwendet. Bis zur Resuspendierung in der mobilen Phase wurden die Proben bei -20 °C eingefroren. Alle

Schritte der Extraktion erfolgten in schwachem Rotlicht.

2.9.3. Auftrennung des Probengemisches

Zur Auftrennung der Proben wurden die eingedampften Extrakte in 25 µl mobiler Phase gelöst und in den Injektor eingespritzt. Die integrierte Probenschleife sorgte für ein konstantes Probenvolumen von 20 µl. Die mobile Phase zur Trennung des 3-Hydroxyretinals bestand aus Diethylether/0,5% Ethanol in Hexan (50:50). Die Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase betrug 2 ml/min.

Die verwendete mobile Phase war aufgrund ihrer Polarität nicht dazu geeignet, Retinal und 3-Hydroxyretinal in derselben Probe zu trennen. Aus technischen Gründen war es nicht möglich, die Retinale zunächst mit einem weniger polaren Lösungsmittel (Diethylether/0,15% Ethanol in Hexan, 15:85) zu eluieren, um dann nach einem Wechsel der mobilen Phase das 3-Hydroxyretinal zu eluieren.

3. Ergebnisse

Carotinoide werden von den Insekten unter anderem als Vorstufen für den Chromophor der Sehfarbstoffe benötigt. Sie sind aber, wie alle anderen Tiere auch, nicht in der Lage, diese Stoffe zu synthetisieren (BRITTON, 1985). Daher ist die Nahrung der Raupen die einzige Quelle, aus der diese Moleküle bezogen werden können.

In grünen Pflanzenteilen, der Nahrung der Raupen, ist ein breites Spektrum unterschiedlicher Carotinoide zu finden (ISLER, 1971), so daß eine ausreichende Versorgung mit den benötigten Vorstufen gewährleistet ist.

Mit den folgenden Experimenten wird der Einfluß von in der Nahrung enthaltenen Carotinoiden auf den Sehfarbstoffgehalt von S. littoralis untersucht. Zunächst wird der Normalzustand nach Aufzucht mit Naturfutter beschrieben. Dann wird der Sehfarbstoffgehalt nach Fütterung mit der carotinoidarmen Diät bestimmt, um danach durch gezielte Zugabe einzelner Carotinoide zu der Diät deren Wirkung auf die Sehfarbstoffsynthese zu untersuchen.

Die Tiere, deren Raupen mit Naturfutter aufgezogen wurden, werden im folgenden Naturfutter-Tiere genannt. Analog dazu werden Tiere, die mit der Vitamin A-armen Diät gefüttert wurden, als Diät-Tiere bezeichnet. Die Bezeichnung Vitamin A-, β -Carotin- oder Zeaxanthin-Tier bedeutet, daß die Raupen mit einer Diät aufgezogen wurden, der das entsprechende Carotinoid zugegeben worden war.

3.1. Der Normalzustand

3.1.1. Aufzucht mit verschiedenen Futterpflanzen

Das visuelle System von S. littoralis unter Normalbedingungen wurde an Imagines untersucht, deren Raupen mit Naturfutter aufgezogen wurden. Den polyphagen Raupen wurden dazu verschiedene Futterpflanzen angeboten. Um eventuelle Einflüsse der unterschiedlichen Pflanzen auf die Raupen auszuschließen, wurde für jede Futterpflanze getrennt die Entwicklungsdauer der Raupen bis

zur Puppe und der Phänotyp der verschiedenen Entwicklungsstadien beobachtet, sowie der Sehfärbstoffgehalt in den Komplexaugen der Imagines gemessen. Die an den Laborzuchten gewonnenen Erkenntnisse wurden mit Ergebnissen von Tieren aus Freilandfängen sowie mit Literaturwerten verglichen.

Als Futterpflanzen für die Laborzuchten standen Weizenkeimlinge, Tomatenpflanzen, Rizinus und Löwenzahn zur Verfügung (2.1.2.1.). Bezüglich der Entwicklungsdauer der Raupen konnten -mit Ausnahme einer um ca. 30% verlängerten Freßphase bei Aufzucht mit Weizenkeimlingen- keine futterabhängigen Unterschiede festgestellt werden. Der Zeitraum zwischen dem Ausschlüpfen der Eilarven und der Verpuppung betrug ungefähr zehn Tage. Weitere Unterschiede, z.B. in der Länge der Puppenruhe oder dem Aussehen der Imagines, konnten nicht beobachtet werden.

Der Sehfärbstoffgehalt in den Augen der Imagines nach Aufzucht der Raupen mit Naturfutter war maximal. In Tabelle 1 sind die Werte für die Sehfärbstoffgehalte pro Retina nach Aufzucht mit den unterschiedlichen Futterpflanzen im Vergleich zu den Freilandtieren aufgelistet. Es wurden dabei nur Messungen berücksichtigt, bei denen die Tiere vor der Präparation einem normalen Tag/Nacht-Rhythmus (LD) ausgesetzt waren.

Die Ergebnisse für die verschiedenen Futterpflanzen unterschieden sich nicht signifikant und wurden deshalb zu einem gemeinsamen Mittelwert zusammengefaßt. Dieser Wert von $8,5 \pm 2,9$ pmol/Retina wird im folgenden als Vergleichswert für die Tiere

Tabelle 1: Sehfärbstoffgehalt in den Augen der Imagines nach Aufzucht der Raupen mit Naturfutter. Die Falter wurden im Tag/Nacht-Rhythmus (LD) gehalten.

Futterpflanze	pmol/Retina	Anzahl der Extrakte
Löwenzahn	8,4 $\pm$ 3,36	17
Rizinus	7,2	1
Tomate	6,1 $\pm$ 1,4	4
Weizen	9,9 $\pm$ 0,2	4
Freiland	7,8	1

benutzt, die unter Tag/Nacht-Photoperiode gehalten wurden. Zur Bestimmung des Sehfarbstoffgehaltes nach Hälterung der Imagines im Dauerdunkel wurden Falter untersucht, deren Raupen mit Löwenzahn oder Rizinus gefüttert worden waren. Die Puppen wurden in lichtundurchlässigen Behältern untergebracht, in denen dann auch die Falter schlüpften. Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse dieser Versuche.

Da sich auch in diesem Fall die Sehfarbstoffgehalte nach Aufzucht mit den beiden Futterpflanzen nicht unterschieden, wurde auch hier ein gemeinsamer Mittelwert gebildet. Dieser Wert liegt mit $12,4 \pm 2,2$ pmol/Retina signifikant über demjenigen, der nach Haltung der Tiere im Tag/Nacht-Rhythmus gefunden wurde.

Tabelle 2: Sehfarbstoffgehalt in den Augen der Imagines nach Aufzucht der Raupen mit Naturfutter. Die Falter wurden im Dauerdunkel (DD) gehalten.

Futterpflanze	pmol/Retina	Anzahl der Extrakte
Löwenzahn	$13,34 \pm 0,64$	4
Rizinus	$12,48 \pm 2,9$	9

3.1.2. Das Sehfarbstoffsystem

Die Kenntnis der Komponenten des Sehfarbstoffsystems von S. littoralis unter naturähnlichen Bedingungen, d.h. nach Aufzucht der Raupen mit Naturfutter, ist Voraussetzung, um die folgenden Versuche zum Einfluß von Carotinoiden und Licht auf dieses System beurteilen zu können.

Zunächst wurde das für S. exempta beschriebene tetrachromatische Sehfarbstoffsystem (s. Einleitung S. 13) in Extrakten aus Retinae von S. littoralis untersucht. Daran anschließend folgte die Untersuchung der beiden Bestandteile des Sehfarbstoffmoleküls, der Proteinkomponente (Opsin) und des Chromophors.

3.1.2.1. Charakterisierung der Sehfärbstoffe

Zur Untersuchung der einzelnen Sehfärbstoffe wurden Digitonin-Extrakte aus Retinae von Naturfutter-Tieren hergestellt (2.4.1.). Die Messungen wurden bei 5 °C durchgeführt, um thermolabile Sehfärbstoffe und deren Metarhodopsin messen zu können.

Die Extrakte wurden mit monochromatischem Licht bestrahlt, um die einzelnen Sehfärbstoffe zu bleichen. Dabei wurde üblicherweise mit langwelligem Licht begonnen. Aus den Differenzspektren (2.5.1.) wurden mit Hilfe eines Computerprogrammes die Absorptionskurven der Sehfärbstoffe berechnet. Dabei wurden Nomogramme nach Ebrey und Honig als Berechnungsgrundlage vorgegeben. Abb. 5 zeigt das im Extrakt gemessene Differenzspektrum (xxx), die daraus berechneten Absorptionskurven für den Sehfärbstoff (S), seine Metaform (M) bzw. im Falle des blauen Sehfärbstoffes des Retinaloxims (O), sowie das aus (S) und (M) bzw. (O) berechnete Differenzspektrum (D). Man erkennt, daß die photometrisch und rechnerisch ermittelten Differenzspektren nahezu deckungsgleich sind, und damit die berechneten Werte gut mit den tatsächlichen übereinstimmen.

Zur Suche nach einem langwellig absorbierenden Sehfärbstoff wurden die Retinae der dunkeladaptierten Falter im Infrarotlicht unter Zuhilfenahme eines Nachtsichtgerätes (AEG) präpariert. Ebenso erfolgten alle weiteren Schritte einschließlich der Befüllung der Meßküvetten unter diesen Bedingungen, um ein vorzeitiges Bleichen des Sehfärbstoffes auszuschließen. Die Belichtung der Extrakte erfolgte mit monochromatischem Licht der Wellenlängen 649 nm oder 707 nm. Es gelang unter diesen Bedingungen jedoch nicht, den gesuchten Sehfärbstoff zu finden.

Im Anschluß an die Bestrahlung mit Rotlicht wurde mit der Wellenlänge 570 nm belichtet. Aus den Differenzspektren wurden die in Abb. 5a dargestellten Absorptionskurven für den Grünrezeptor und sein Metarhodopsin errechnet. Das Absorptionsmaximum des Sehfärbstoffes lag bei 530 nm, das des Metarhodopsins bei 480 nm.

Nachdem keine weiteren Extinktionsänderungen mehr registriert werden konnten, wurden die nächsten Belichtungen mit Licht der Wellenlänge 517 nm vorgenommen. Die Absorptionsmaxima des blauen Sehfärbstoffes und seines Metarhodopsins liegen nur ca. 20 nm auseinander. Aus diesem Grunde kann mit der oben beschriebenen Vorgehensweise kein Differenzspektrum gemessen werden, da die Extinktionsabnahme aufgrund des gebleichten Sehfärbstoffes die Extinktionszunahme durch entstehendes Metarhodopsin kompensiert. Die Zugabe von Hydroxylamin zu den Extrakten (Endkonzentration 0,1 mM) führte zum "Ausbleichen" des Sehfärbstoffes, d.h. Opsin und Chromophor werden getrennt, und es bildet sich das Retinaloxim mit einem Absorptionsmaximum bei 368 nm (DAVSON, 1977). Auf diese Weise ergaben sich Differenzspektren, die eine maximale Abnahme der Extinktion bei 460 nm zeigten, und eine entsprechende Zunahme bei 368 nm durch entstandenes Retinaloxim. Daraus wurde für den blauen Sehfärbstoff ein Absorptionsmaximum von 488 nm berechnet (Abb. 5b).

Weiterhin wurden Extrakte mit UV-Licht der Wellenlänge 348 nm bestrahlt. Die Messung dieses Sehfärbstoffes war nur in Extrakten ohne Hydroxylamin möglich, da sich die Extinktionsabnahme aufgrund des Bleichens des Sehfärbstoffes und die Zunahme durch entstehendes Retinaloxim kompensierten. Da bei Raumtemperatur das durch Belichtung entstehende Metarhodopsin thermolabil ist, findet in diesem Fall eine Kompensation der Extinktionsabnahme (aufgrund des Bleichens des Sehfärbstoffes) durch entstehendes Retinal (Zerfall des Metarhodopsins) statt. Deshalb wurden die Extrakte im Photometer bei 5 °C gemessen. Das entstehende Metarhodopsin war unter diesen Bedingungen stabil und konnte durch Belichtung mit 471 nm wieder in den Sehfärbstoff umgewandelt werden. Das Differenzspektrum und die errechneten Werte für den UV-Sehfärbstoff sind in Abb. 5c dargestellt. Für den Sehfärbstoff ergab sich eine maximale Absorption bei 361 nm und für die Metaform bei 479 nm.

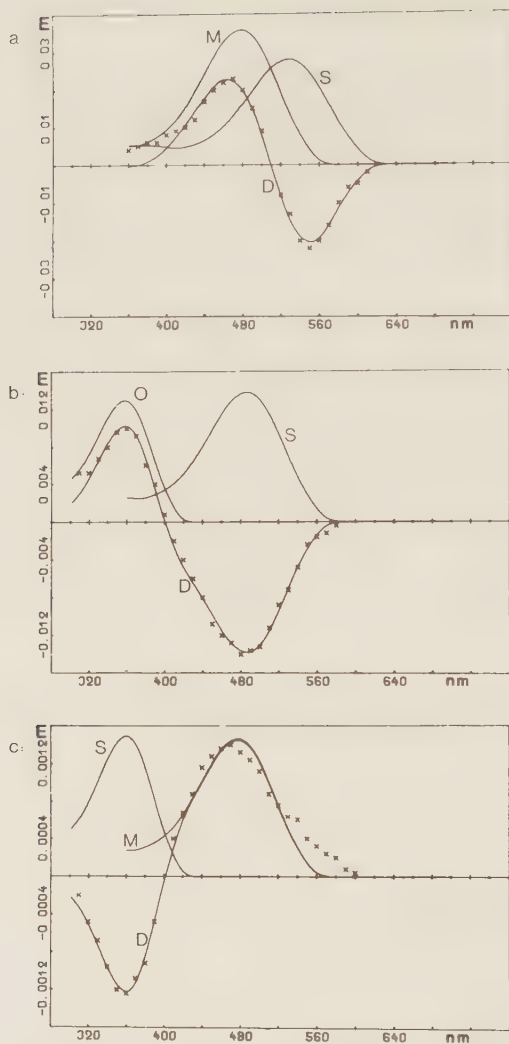


Abb. 5: Spektralphotometrischer Nachweis von Sehfärbstoffen in Digitonin-Extrakten: photometrisch ermittelte Differenzspektren (xxx), nach Ebrey und Honig daraus berechnete Absorptionskurven für den Sehfärbstoff (S) und seine Metaform (M) bzw. das Retinaloxim (O) im Falle des blauen Sehfärbstoffes, sowie die aus (S) und (M) bzw. (O) berechneten Differenzspektren (D)
a: Grünsehfärbstoff b: Blausehfärbstoff c: UV-Sehfärbstoff

3.1.2.2. Charakterisierung des Opsins

Die Charakterisierung des Opsins, der Proteinkomponente des Sehfärbstoffmoleküls, erfolgte mit gelelektrophoretischen Methoden.

Einen ersten Hinweis auf die Lage des Opsins in elektrophoretisch aufgetrennten SDS-Extrakten ergab der direkte Vergleich zweier Proben aus Retinae von Diät- und Naturfutter-Tieren. Dabei zeigten sich nach Anfärbung der Gele mit Coomassie-Blau gleiche Proteinmuster, wobei jedoch bei den Naturfutter-Tieren eine Bande sehr viel stärker ausgeprägt war als bei den Diät-Tieren (Abb. 6, 1-2).

Die Identifizierung des Opsins erfolgte durch Reduktion mit Dimethylamin-Boran (HALL & BOK, 1982) (2.6.7.). Bei Betrachtung im UV-Licht war die Opsin-Bande die einzige aufgrund ihrer schwachen Fluoreszenz zu erkennende Bande (Abb 6, 6-7). Die Markierungen der Fluoreszenz stimmten, nach Anfärbung mit Coomassie-Blau, genau mit den beiden unterschiedlich stark ausgeprägten Banden bei Diät- und Naturfutter-Tieren überein. Die Molekulargewichtsbestimmung wurde ebenfalls anhand der Elektrophorese durchgeführt. Aus den Wanderungsstrecken der vier Proteine bekannten Molekulargewichts, die als Markergemisch mit auf das Gel aufgetragen waren (2.6.5.), konnte eine Eichgerade erstellt werden, aus der das Molekulargewicht des Opsins errechnet wurde. Das so bestimmte Molekulargewicht betrug 40.000 ± 500 .

Der Glykoproteincharakter des Opsins wurde ebenfalls dazu benutzt die Opsin-Bande auf den Gelen zu identifizieren. Um diesen nachweisen zu können, wurde eine spezielle Färbung (2.6.6.) durchgeführt und mit der Coomassie-Färbung und der Fluoreszenzmarkierung verglichen. Abb. 6 zeigt diese drei Nachweise im Vergleich. Mit den unterschiedlichen Methoden wurden jeweils dieselben Banden angefärbt bzw. markiert.

Zusammenfassend handelt es sich bei dem Opsin von Spodoptera also um ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ungefähr 40.000.

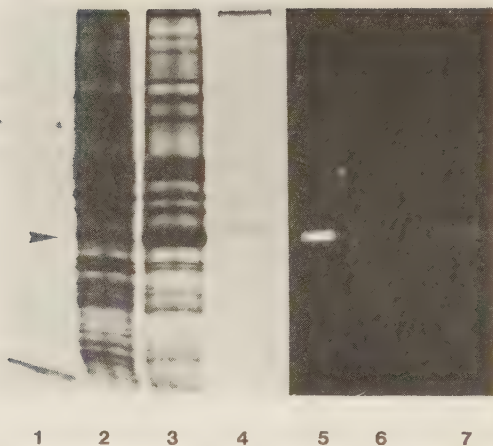


Abb. 6: Identifizierung des Opsins (Pfeil) in Polyacrylamid-Gelen durch unterschiedliche Nachweise.
 1-3 Coomassie-Blau-Färbung: 1 Markerproteine, Extrakte aus Diät- (2) und Naturfutter-Tieren (3); 4 Glykoprotein-Färbung: Extrakt aus Naturfutter-Tieren; 6-7 Fluoreszenz nach Reduktion der Sehfärbstoffe im SDS-Extrakt mit Dimethylamin-Boran: 6 Diät-, 7 Naturfutter-Tiere (5 Schnitt im Gel zur späteren Identifizierung der fluoreszierenden Banden)

3.1.2.3. Charakterisierung des Chromophors

Eine charakteristische Komponente des Sehfärbstoffmoleküls ist dessen Chromophor. Er ist bei allen bisher bekannten Sehfärbstoffen ein Derivat des Vitamins A. Bei den Insekten wurden bisher sowohl das Retinal als auch das 3-Hydroxyretinal als Chromophor beschrieben.

Zur Identifizierung des Chromophors im vorliegenden Sehfärbstoffsystem wurden Extrakte aus den Retinae von Naturfutter-Tieren dünnschicht- und flüssigkeitschromatographisch untersucht.

Die dünnschichtchromatographische Trennung von Retinacextrakten von Naturfutter-Tieren und von Referenzsubstanzen ist in Abb. 7 dargestellt. Abbildung 7a zeigt ein Chromatogramm, das mit der herkömmlichen Methode angefärbt wurde. Diese basiert auf der Carr-Price-Reaktion zum Nachweis von Vitamin A mit Antimontri-

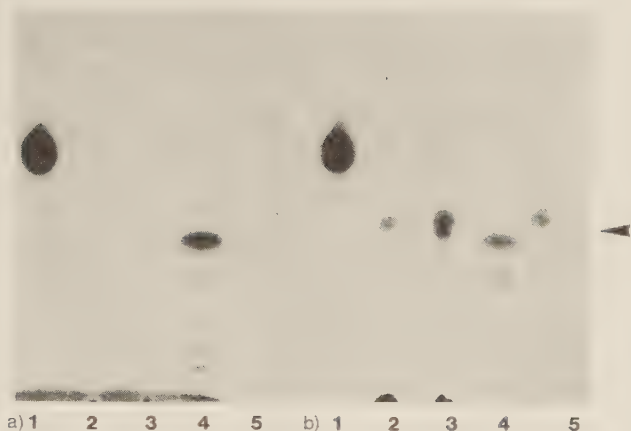


Abb. 7: Identifizierung des Chromophors in Retinaextrakten, Dünnschichtchromatographie: 2 Naturfutter-Tiere, 3 Diät-Tiere nach Injektion von Retinal*; Referenzsubstanzen: bestrahlte Lösungen von all-trans Retinal (1), all-trans 3-Hydroxyretinal (4) und Cholesterin (5); Pfeil: all-trans 3-Hydroxyretinal
a Anfärben der Proben mit SbCl_3 /Chloroform, b zusätzliches Anfärben mit Vanillin/Ethanol/Schwefelsäure

chlorid (SbCl_3 in Chloroform). Das Chromatogramm in Abb. 7b wurde zusätzlich mit einer Vanillin-Ethanol-Lösung besprüht (2.8.5.). Das Ergebnis zeigt eine deutlich höhere Empfindlichkeit des Nachweises, der außerdem über mehrere Wochen stabil ist.

Die Ergebnisse der Untersuchungen des Chromophors mittels HPLC sind in Abb. 8 wiedergegeben. Abbildung 8a zeigt das Chromatogramm des als Referenz verwendeten 3-Hydroxyretinals. Für die Chromatogramme in Abb. 8b,c wurden Digitonin-Extrakte aus Retinae von Naturfutter-Tieren verwendet. Die Tiere waren zuvor entweder im Dauerdunkel oder bei normalem Tag/Nacht-Rhythmus gehalten worden. (Aufarbeitung und Extraktion 2.3./2.9.2.). Vor der Extraktion des Chromophors wurde der Sehfärbstoffgehalt des Digitonin-Extraktes von Abb. 8b photometrisch bestimmt und dabei gebleicht, der von Abb. 8c jedoch nicht. Die Extraktion des Chromophors aus den beiden Digitonin-Extrakten erfolgte wie unter 2.8.2.2. beschrieben.

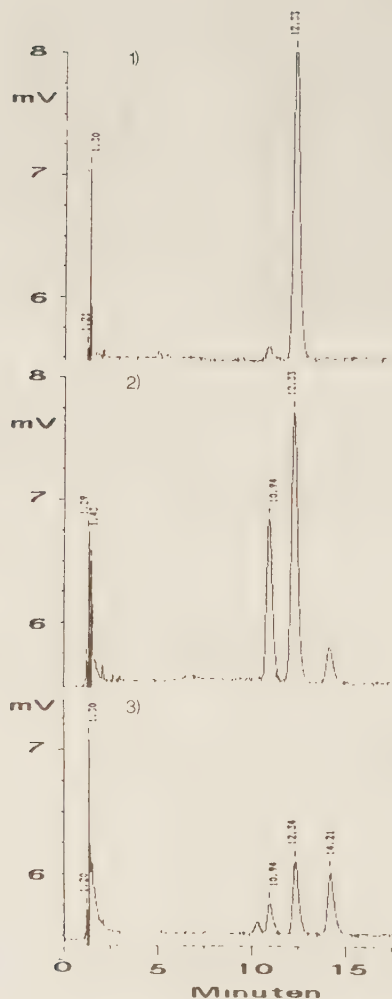


Abb. 8: Identifizierung des Chromophors in Retinaextrakten, HPLC: 1 all-trans 3-Hydroxyretinal als Referenzsubstanz; 2 Naturfutter-Tiere, helladaptiert; 3 Naturfutter-Tiere, dunkeladaptiert. Retentionszeiten der Isomere des 3-Hydroxyretinals: 10.94 min: 13-cis; 12.35 min: all-trans; 14.21 min: 11-cis. (mobile Phase Ether/0,5% Ethanol in Hexan (1:1), 2 ml/min)

Wie aus dem Vergleich mit dem in Abb. 8a dargestellten Chromatogramm des reinen all-trans 3-Hydroxyretinals (Retentionszeit 12.35 min) hervorgeht, stellt in dem gebleichten Extrakt das all-trans Isomer die Hauptkomponente dar. Das 11-cis Isomer (Retentionszeit 14.21 min) kommt nur in geringen Mengen vor. Bei dem Isomer mit der Retentionszeit 10.94 min handelt es sich wahrscheinlich um das 13-cis 3-Hydroxyretinal (ITO et al., 1988).

In dem ungebleichten Extrakt kommen 11-cis und all-trans Isomer in ungefähr gleichen Mengen vor, und es findet sich nicht die zu erwartende Dominanz des 11-cis Isomers. Dies ist darauf zurückzuführen, daß das 11-cis Isomer im ungebleichten Zustand an das Opsin gebunden, und mit der verwendeten Extraktionsmethode nur schwer zu extrahieren ist. Beim thermolabilen Metarhodopsin dagegen löst sich das all-trans Isomer bei Zimmertemperatur vom Opsin und kann somit besser extrahiert werden (PEPE & SCHWEMER, 1987). Die gefundenen Mengen zeigen also im ungebleichten Extrakt nicht das tatsächliche Verhältnis zwischen den beiden Isomeren, da der Anteil des 11-cis Isomers aufgrund der Versuchsbedingungen zu niedrig ist. In dem gebleichten Extrakt wurde der Sehfärbstoff durch die Belichtung nahezu vollständig in Metarhodopsin überführt; man kann also von einem hohen Gehalt des gut zu extrahierenden all-trans Isomers ausgehen. In diesem Fall sollte das Verhältnis zwischen den Isomeren also den tatsächlichen Gegebenheiten entsprechen. Der Unterschied zwischen gebleichten und ungebleichten Extrakten bezüglich der Verteilung der Isomere wird trotz der zu machenden Einschränkung deutlich.

3.1.3. Besonderheiten der gelbäugigen Mutante

Neben dem dunkeläugigen Wildtyp wurde auch ein Stamm einer gelbäugigen Mutante von S. littoralis untersucht (DITTRICH & LUETKE-MEIER, 1980). Dieser Mutante fehlen fast vollständig die Omochrom-Schirmpigmente (LANGER, pers. Mitteilung). Sie wies aber sonst keine weiteren für die Versuche relevanten Unterschiede gegenüber dem Wildtyp auf. Aufgrund der fehlenden Schirmpigmente ist das Auge besonders lichtempfindlich.

Wurden Falter, deren Raupen mit Naturfutter aufgezogen worden waren, vor dem Schlüpfen im Dauerdunkel gehalten, so war gegenüber dem Wildtyp -abgesehen von fehlenden Granula in den Pigmentzellen- weder ein Unterschied in der Morphologie der Sehzellen noch im Sehfarbstoffgehalt festzustellen. Wurden die Falter jedoch in einem natürlichen Tag/Nacht-Rhythmus gehalten, so war abhängig von der Intensität des Lichtes und der Expositionsdauer eine drastische Reduktion des Sehfarbstoffgehaltes die Folge. Damit verbunden war eine massive Zerstörung der Ultrastruktur der Retina. In Tabelle 3 sind die Sehfarbstoffgehalte von Wildtyp und Mutante gegenübergestellt.

Die lichtinduzierte Reduktion des Sehfarbstoffgehaltes ist, abhängig vom Ausmaß der Schädigung, in beschränktem Umfang reversibel. Nach 36 stündiger Dunkeladaptation konnte ein Anstieg des Sehfarbstoffgehaltes in den Augen der Mutante von 1,2 pmol/Retina auf 3,0 pmol/Retina festgestellt werden.

Tab. 3: Vergleich der Sehfarbstoffgehalte von Wildtyp und Mutante nach Hälterung unter verschiedenen Lichtbedingungen. (n= Anzahl der Extrakte)

	DD	n	LD	n
Mutante	10,1 ± 3,7	8	1,4 ± 0,3	8
Wildtyp	12,4 ± 2,2	13	8,5 ± 2,9	27

3.2. Fütterungsexperimente

Neben der oben beschriebenen Art der Aufzucht der Raupen mit Naturfutter besteht die Möglichkeit, diese mit einer halbsynthetischen, carotinoidarmen Diät aufzuziehen. Sie enthält alle für die Entwicklung der Tiere notwendigen Komponenten. Mangelerscheinungen in Bezug auf Entwicklung und Fertilität bedingt durch die Aufzucht mit dieser Diät waren während der gesamten Dauer der Versuche (>30 Generationen) nicht festzustellen. Es ist so möglich, eine langfristig gleichbleibende Versorgung der Tiere mit den benötigten Nährstoffen zu gewährleisten.

Der Diät können unterschiedliche Carotinoide zugegeben werden, um deren Einfluß auf den Sehfarbstoffgehalt in den Augen der Imagines zu testen.

3.2.1. Aufzucht mit der Diät

Die Aufzucht der Versuchstiere mit der carotinoidarmen Diät führte zu einer Verringerung des Sehfarbstoffgehaltes in den Augen der Imagines. Bei der elektrophoretischen Trennung gleicher Proteinmengen aus Retinae von Diät- und Naturfutter-Tieren konnte ein deutlicher Unterschied in der Ausprägung der Opsin-Bande festgestellt werden (Abb. 9a)

Die photometrische Bestimmung des Sehfarbstoffgehaltes in den Augen von Diät-Tieren zeigte, verglichen mit den Naturfutter-Tieren, eine deutliche Verringerung der Sehfarbstoffkonzentration. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tabelle 4 dargestellt. Es wurde dabei wieder zwischen Tieren aus dem Dauerdunkel und solchen unterschieden, die im natürlichen Tag/Nacht-Rhythmus gehalten wurden.

Der Unterschied im Sehfarbstoffgehalt zwischen LD- und DD-Haltung bei den Diät-Tieren ist nicht signifikant. Daher wurden diese Werte zu einem gemeinsamen Mittelwert ($0,82 \pm 0,45$ pmol/Retina) zusammengefaßt. Dieser stellt den mittleren Sehfarbstoff

gehalt pro Retina über den gesamten Versuchszeitraum dar; er wird bei der Beurteilung der Wirksamkeit unterschiedlicher getesteter Substanzen als Basiswert zugrundegelegt.

Tab. 4: Vergleich des Sehfärbstoffgehaltes nach Aufzucht des Wildtyps mit Diät bzw. mit Naturfutter, und dessen Abhängigkeit von den Lichtbedingungen (n= Anzahl der Extrakte).

	LD	n	DD	n
Diät	$0,7 \pm 0,4$	9	$1,0 \pm 0,5$	11
Naturfutter	$8,5 \pm 2,9$	27	$12,4 \pm 2,2$	13

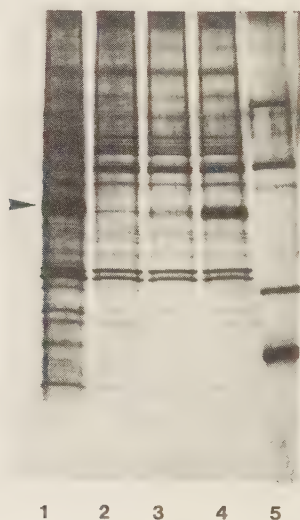


Abb. 9: Elektrophoretische Trennung von Proteinen aus Retina-extrakten nach Aufzucht der Raupen mit Naturfutter oder unterschiedlichen Diäten : 1 Naturfutter 2 Diät + β -Carotin, 3 Diät + Vitamin A, 4 Diät + Zeaxanthin, 5 Markergemisch; Pfeil: Opsin (SDS-Polyacrylamidgel nach Silberfärbung)

3.2.2. Carotinoidgehalt des Futters

Der Sehfärbstoffgehalt der Imagines von *S. littoralis* wird im wesentlichen durch die Zusammensetzung der Carotinoide und deren Konzentration im Futter der Raupen beeinflusst. Deshalb ist die Kenntnis der in der Nahrung vorhandenen Carotinoidmengen für die unter 3.2.3. beschriebenen Fütterungsexperimente notwendig.

Der Gesamtcarotinoidgehalt in Naturfutter und Diät wurde wie unter 2.5.2. beschrieben ermittelt. Die Extinktionsspektren der Extrakte haben die für Carotinoide typische dreigipfelige Form. Die Zuordnung einzelner Komponenten aufgrund spektralphotometrischer Daten ist wegen der Vielzahl der in den Rohextrakten enthaltenen Carotinoide nicht möglich. Der Gesamtcarotinoidgehalt lag für die grünen Pflanzenteile bei $0,16 \pm 0,04$ mg/g Frischgewicht (Mittelwert aus 6 Extrakten). Dieser Wert stimmt gut mit den in der Literatur angegebenen Konzentrationen von $0,15$ mg/g Frischgewicht überein (TAKAGI, 1985).

Die Fütterungsexperimente wurden so angelegt, daß verschiedene in der natürlichen Nahrung vorkommende Carotinoide einzeln auf ihre Wirksamkeit für die Sehfärbstoffsynthese getestet werden konnten. Die entsprechenden Verbindungen wurden als Reinsubstanzen zu der Diät gemischt. Die Konzentration der Testsubstanz in der Diät entsprach etwa der Gesamtkonzentration aller Carotinoide im Naturfutter (Tab. 5).

Tab. 5: Carotinoidgehalt in den für die Fütterungsexperimente verwendeten Diäten mit Zusatzstoffen (Mittelwerte aus drei verschiedenen Diät-Chargen).

	mg/g Diät
Zeaxanthin	$0,15 \pm 0,01$
β -Carotin	$0,17 \pm 0,06$
Vitamin A	$0,18 \pm 0,05$
Retinolacetat	0,46

3.2.3. Aufzucht mit der Diät mit Zusatzstoffen

Als Maß für die Wirksamkeit der zu testenden Substanzen wurde der Sehfärbstoffgehalt in den Komplexaugen der Imagines bestimmt. Als Vergleichsbasis dienten die Augen von Imagines, deren Raupen mit derselben Charge der Diät, aber ohne Zusätze, aufgezogen wurden, der auch die zu testenden Substanzen zugegeben wurden.

In Abbildung 10 und Tabelle 6 sind die Sehfärbstoffgehalte in den Augen der Imagines nach Fütterung mit den entsprechenden Diäten zusammengestellt.

Auch bei dieser Versuchsserie wurde zwischen der Hälterung der Puppen bzw. Imagines im Dauerdunkel und bei Tag/Nacht-Rhythmus unterschieden. Da keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Hälterungsbedingungen festgestellt werden konnten, wurde ebenfalls ein gemeinsamer Mittelwert aus beiden Gruppen gebildet.

3.2.4. Bestimmung von verbrauchter Futtermenge und Puppengewicht

Durch den Vergleich einiger wichtiger Parameter in der Entwicklung der Tiere sollte festgestellt werden, ob Unterschiede zwischen der Aufzucht der Raupen mit der Diät, bzw. der Diät mit Zusatzstoffen, und der Aufzucht mit Naturfutter bestehen. Die Werte für die pro Raupe verbrauchte Futtermenge von ungefähr 3 g stimmen mit den in der Literatur angegebenen Werten überein (BISHARA, 1934).

Um einen negativen Einfluß durch die der Diät zugesetzten Carotinoide auf die Attraktivität des Futters -und einer damit verbundenen Verminderung der Nahrungsaufnahme- festzustellen, wurden die von den Raupen gefressenen Nahrungsmengen bestimmt. Dazu wurden den Raupen jeweils abgewogene Futtermengen angeboten, und die nicht verbrauchten Reste zurückgewogen. In Tabelle 7 sind die von den Raupen verbrauchten Futtermengen und die darin enthalte-

nen Mengen an Carotinoiden wiedergegeben.

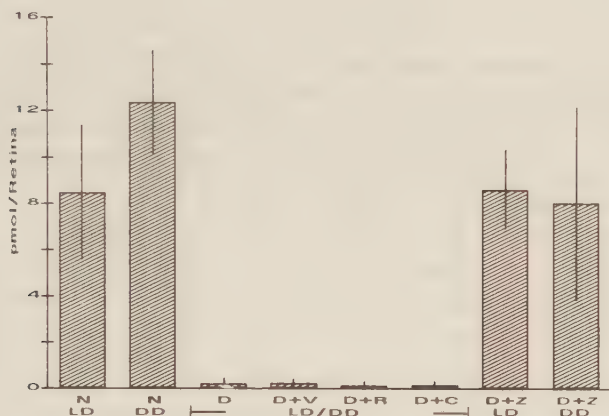


Abb. 10: Sehfarbstoffgehalte in den Komplexaugen der Imagines nach Aufzucht der Raupen mit Naturfutter oder Diät bzw. angereicherter Diät

(N: Naturfutter, D: Diät, D+V: Diät mit Vitamin A, D+R: Diät mit Retinolacetat, D+C: Diät mit β -Carotin, D+Z: Diät mit Zeaxanthin, DD: Dauerdunkel, LD: Tag/Nacht-Rhythmus, LD/DD: Mittelwert aus LD und DD)

=====
Signifikanz der Unterschiede der Mittelwerte (mit 99% Wahrscheinlichkeit verschieden, wenn $x > 2,58$)

Vergleich von	x
N(LD)/N(DD)	3,6
D+Z(LD)/D+Z(DD)	0,31
N(DD)/D+Z(DD)	2,4

Tab. 6: Sehfarbstoffgehalt nach Aufzucht der Raupen mit verschiedenen Zusatzstoffen in der Diät. (DD: Puppen und Imagines im Dauerdunkel, LD: Puppen und Imagines im Tag/Nacht-Rhythmus, MW DD/LD: Mittelwert aus beiden Gruppen, n: Einzelversuche).

Zusatz zur Diät	DD	n	LD	n	MW DD/LD
ohne	---	-	0,24 $\pm$ 0,2	3	---
Zeaxanthin	8,06 $\pm$ 4,1	5	8,64 $\pm$ 1,7	4	8,3 $\pm$ 2,9
β -Carotin	0,12 $\pm$ 0,1	4	0,18 $\pm$ 0,3	2	0,17 $\pm$ 0,1
Vitamin A	0,24 $\pm$ 0,2	4	0,33	1	0,26 $\pm$ 0,1
Retinolacet.	0,15 $\pm$ 0,1	2	---	-	---

Tab. 7: Bei den Fütterungsexperimenten verbrauchte Futtermengen pro Raupe, sowie die darin enthaltene Menge an Carotinoiden (Mittelwerte aus drei Versuchsserien mit jeweils bis zu 20 Raupen).

	g Futter/Raupe	mg Carotinoide/Raupe
Diät	3,14 ± 0,6	0,0003
Diät + Zeaxanthin	2,77 ± 0,3	0,4 ± 0,04
Diät + β -Carotin	2,74 ± 0,2	0,4 ± 0,02
Diät + Vitamin A	2,49 ± 0,1	0,4 ± 0,04
Diät + Retinolacetat	2,74 ± 0,3	1,2 ± 0,01

Die von den Raupen gefressenen Futtermenge ist in allen Fällen etwa gleich hoch. Einflüsse auf die Attraktivität des Futters durch den Zusatz der Carotinoide sind nicht festzustellen.

Ein weiterer Parameter, der für die Beurteilung der Entwicklung der Tiere herangezogen werden kann, ist das Puppengewicht. Dabei dürfen nur Puppen verglichen werden, die aus gleicher Umgebungsfeuchte kommen und die gleiches Alter haben. Dies ist notwendig, da der Wassergehalt der Puppen mit fortschreitender Entwicklung abnimmt und sich das Puppengewicht dadurch bis zu 20% verringert. Das Ausmaß des Wasserverlustes hängt stark von der Feuchte des Substrates ab, auf bzw. in dem sich die Puppen befinden.

Unter Berücksichtigung der vorgenannten Bedingungen wurden die Puppengewichte für frisch verpuppte Tiere bestimmt. Obwohl die Freßphase der Naturfutter-Tiere, und damit deren Entwicklungsdauer, gegenüber den Diät-Tieren um etwa 20% verlängert war, unterschieden sich die Puppengewichte nicht voneinander. Für die Diät-Tiere wurden $0,27 \pm 0,03$ g ($n=38$) ermittelt, und für die Naturfutter-Tiere $0,24 \pm 0,03$ g ($n=36$). In einer weiteren Versuchsserie wurden die Puppengewichte von jeweils 15 Diät- und Zeaxanthin-Tieren ermittelt. In diesem Fall ergab sich für jede der beiden Gruppen ein Gewicht von $0,33 \pm 0,04$ g pro Puppe.

3.2.5.

Untersuchung von Hämolymphe und Fäces

Parallel zur Bestimmung des Carotinoidgehaltes der Nahrung und der Fäces wurde auch das Vorkommen von Carotinoiden in der Hämolymphe der Raupen photometrisch und dünnschichtchromatographisch untersucht. Einen ersten Hinweis auf Unterschiede in deren Zusammensetzung ergab sich aus der Farbe der frisch gewonnenen Hämolymphe. Die Hämolymphe der Naturfutter- und Zeaxanthin-Tiere zeigte eine kräftige Grünfärbung, wogegen die der übrigen Raupen eine blasse Grünfärbung aufwies. Die Analyse der Extrakte ergab, daß die Gesamtcarotinoidmenge in der Hämolymphe der Diät-, Vitamin A- und β -Carotin-Tiere sehr viel niedriger lag als bei den Naturfutter- und Zeaxanthin-Tieren (ca. 10% der bei Naturfutter-Tieren gefundenen Menge). In der Hämolymphe der Naturfutter-Tiere war hauptsächlich Zeaxanthin und Vitamin A zu finden, in geringen Mengen auch β -Carotin (Abb. 11). Die Hämolymphe der Zeaxanthin-

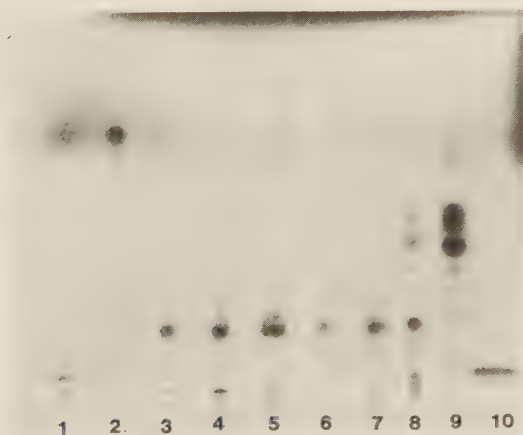


Abb. 11: Dünnschichtchromatogramm von Extrakten aus der Hämolymphe von Raupen nach Aufzucht mit Naturfutter oder unterschiedlichen Diäten. Extrakte: 3 Rizinus, 4 Diät + Zeaxanthin, 5 Diät + β -Carotin, 6 Löwenzahn, 7 Diät; Referenzsubstanzen: 1 Zeaxanthin, 2 β -Carotin, 8 Vitamin A, 9 Retinal*, 10 3-Hydroxyretinal* (SbCl₃/Vanillin-Färbung)

Tiere wies ein sehr ähnliches Verteilungsmuster auf, wogegen bei den Raupen nach Aufzucht mit der Diät, bzw der Diät mit Vitamin A oder β -Carotin hauptsächlich Vitamin A und β -Carotin gefunden wurden.

Zur Analyse des Proteinmusters wurden Extrakte aus der Hämolymphe der Raupen von Naturfutter- und Diät-Tieren elektrophoretisch aufgetrennt (2.6.). Das Ergebnis einer solchen Elektrophorese zeigt die Abbildung 12. An den durch Pfeile markierten Stellen sind Unterschiede im Proteinmuster zu erkennen. Die verschieden starke Ausprägung einiger Proteinbanden wird auf Unterschiede in der Zusammensetzung des Futters zurückgeführt, da die Tiere unter sonst gleichen Bedingungen aufgezogen wurden.

Eine mögliche Veränderung der in der Diät enthaltenen Carotinoide nach der Passage durch den Darm der Raupen wurde anhand von Ace

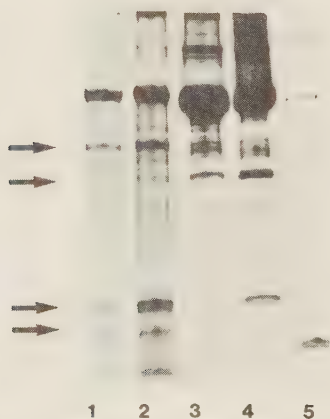


Abb. 12: Elektrophoretische Trennung von Proteinen aus der Hämolymphe der Raupen von Diät- und Naturfutter-Tieren. 1 und 2 Extrakte aus dem Sediment der unbehandelten Hämolymphe (1 D- 2 N-Tiere), 4 und 5 Extrakte aus dem mit Aceton gefällten Überstand von 1 bzw. 2 (4 D- 5 N-Tier), 5 Markerproteine. Die Pfeile markieren Unterschiede in der Proteinmenge zwischen den Extrakten aus D- und N-Tieren.
(SDS-Polyacrylamidgel nach Coomassie-Färbung)

ton-Extrakten aus deren Fäces untersucht. Das in diesen Extrakten gefundene Carotinoidmuster stimmt mit demjenigen aus den Extrakten der Diäten überein. Lediglich nach der Fütterung mit der β -Carotin-Diät ließen sich zusätzlich Spuren von Vitamin A nachweisen. Die semiquantitative Auswertung der Extrakte aus den Fäces ergab eine im Vergleich zu Extrakten aus der verfütterten Diät geringere Konzentration an Carotinoiden (im Falle des Zeaxanthins bis zu 60%).

3.2.6. Besonderheiten der gelbäugigen Mutante

Die Fütterungsversuche mit der mit Carotinoiden angereicherten Diät führten bei der gelbäugigen Mutante zu ähnlichen Ergebnissen wie nach Aufzucht der Raupen mit Naturfutter. Wurden Puppen und Imagines im Dauerdunkel gehalten, so konnten keine Unterschiede zum Wildtyp festgestellt werden (Abb. 13). Für den Fall der Lichtexposition ergaben sich jedoch deutliche Unterschiede im Sehfärbstoffgehalt, der bei natürlichem Tag/Nacht-Rhythmus gegenüber dem Wildtyp deutlich reduziert war. Dies traf in besonderem Maße für die Tiere zu, deren Raupen mit der Diät mit Zeaxanthin aufgezogen wurden. Die Tiere zeigten bei Haltung im Dauerdunkel einen ähnlich hohen Sehfärbstoffgehalt wie der Wildtyp. Durch Lichteinfluß sank der Sehfärbstoffgehalt von 8 pmol/Retina ($n=5$) im Dauerdunkel auf 2,4 pmol/Retina ($n=5$) und in Einzelfällen auf nicht mehr nachweisbare Mengen ab. Für die Diäten mit β -Carotin und Vitamin A lagen die ermittelten Sehfärbstoffgehalte auf gleichem Niveau wie bei der Diät ohne Zusatzstoffe ($0,25 \pm 0,3$ pmol/Retina) (vgl. 3.1.3.).

Eine weitere Besonderheit trat bei der Belichtung von Sehfärbstoffextrakten aus Retinae von Tieren auf, die vor der Präparation dem Tageslicht ausgesetzt waren. Hier war das Maximum der Extinktionsabnahme in den Differenzspektren im Vergleich zu Tieren aus dem Dauerdunkel um ca. 20-30 nm zu kürzeren Wellenlängen verschoben.

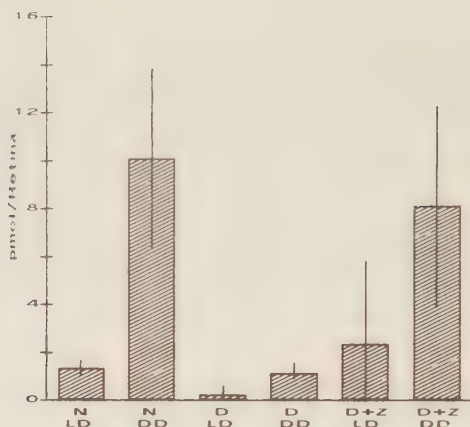


Abb. 13: Sehfärbstoffgehalt der gelbäugigen Mutante in Abhängigkeit von der Nahrung der Raupen und den Lichtverhältnissen bei der Hälterung der Imagines (N: Naturfutter, D: Diät, D+Z: Diät mit Zeaxanthin, DD: Dauerdunkel, LD: Tag/Nacht-Rhythmus)

3.3. Injektionsexperimente mit Carotinoiden

Die Wirksamkeit der in den Fütterungsexperimenten getesteten Carotinoide sowie von Retinal und 3-Hydroxyretinal wurde auch mit Hilfe von Injektionsversuchen untersucht. Dabei wurden die Substanzen in Tiere von unterschiedlichen Entwicklungsstadien injiziert. Die Injektionen erfolgten - jeweils unter Ausschluß der vorangehenden Entwicklungsstufe(n) oder der vorherigen Transport- oder Speicherschritte - entweder in die Hämolymphe der Raupen (Umgehung von Darmassage und Resorption), der Puppen (Übergehen des Raupenstadiums) oder der Falter (Übergehen aller Jugendstadien). Die letzte Stufe war die Injektion direkt an den Wirkort der Substanzen, das Auge. Als Maß für die Wirksamkeit aller Injektionen wurde der Sehfärbstoffgehalt in den Komplexaugen der Imagines bestimmt.

3.3.1. Injektionen in die Raupen

3.3.1.1. Sehfärbstoffgehalt nach Injektion

Die Hämolymphe dient u.a. als Transportmedium der aus dem Darminhalt resorbierten Substanzen. Aus diesem Grund wurden die zu testenden Carotinoide in einem ersten Schritt direkt in die Hämolymphe der Raupen injiziert (1 μ l, 28 mM). Die Resorption, die -wie durch die Fütterungsexperimente nachgewiesen wurde - für die verschiedenen Carotinoide unterschiedlich effektiv ist, konnte dadurch gezielt umgangen werden (vgl. 3.2.5.).

Die Injektionen von β -Carotin oder Zeaxanthin führten zu einem geringen, aber signifikanten Anstieg des Sehfärbstoffgehaltes in den Augen der Falter. Die injizierten Retinoide (Vitamin A, Retinal, 3-Hydroxyretinal) hatten im Gegensatz dazu keine Erhöhung der im Auge gefundenen Sehfärbstoffmenge zur Folge. Es war kein Unterschied zwischen den injizierten Tieren und den unbehandelten Kontrollen festzustellen. Die Ergebnisse der Injektionsversuche sind in Tabelle 8 und Abbildung 14 dargestellt.

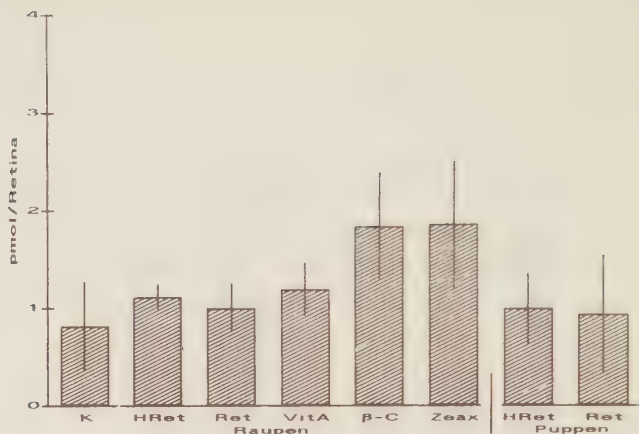


Abb. 14: Sehfärbstoffgehalt in den Augen der Imagines nach Injektion in die Raupen oder Puppen. Puppen und Imagines wurden im Dauerdunkel gehalten.

(K: unbehandelte Kontrolle, HRet: 3-Hydroxyretinal, Ret: Retinal, Vita: Vitamin A, β-C: β-Carotin, Zeax: Zeaxanthin)

Tab. 8: Sehfärbstoffgehalt in den Augen der Imagines nach Injektion in die Hämolymphe der Raupen.

	pmol/Retina	Anzahl der Extrakte
β-Carotin	1,77 ± 0,6	9
Zeaxanthin	1,85 ± 0,7	11
Vitamin A	1,19 ± 0,3	3
Retinal	1,00 ± 0,2	3
3-Hydroxyretinal	1,12 ± 0,1	2
Kontrolle	0,82 ± 0,5	20

=====
Signifikanz der Unterschiede der Mittelwerte (mit 99% Wahrscheinlichkeit verschieden, wenn $x > 2,58$)

Vergleich von	x
β-C/Zeax	0,28
Ret/HRet	0,73
Ret/Vita	0,82
Ret/Zeax	3,47

3.3.1.2. Untersuchung der Hämolymphe nach Injektion

Die Carotinoide in der Hämolymphe wurden mit spektralphotometrischen und dünnschichtchromatographischen Methoden qualitativ untersucht. Dazu wurde den Raupen 24 h nach der Injektion Hämolymphe entnommen. In den Extrakten wurde das gleiche Carotinoidmuster (Abb. 15) wie bei den unter 3.2.5. beschriebenen Untersuchungen nach Fütterung mit der Diät mit Zusatzstoffen gefunden (Abb. 11). Vitamin A und β -Carotin waren in allen Extrakten in sehr geringen Mengen nachweisbar. Ein Anstieg der Zeaxanthin- oder 3-Hydroxyretinalmengen konnte nicht festgestellt werden. Die Ergebnisse zeigen, daß die injizierten Substanzen zum Zeitpunkt der Entnahme nicht mehr frei oder an Proteine gekoppelt in der Hämolymphe transportiert wurden.

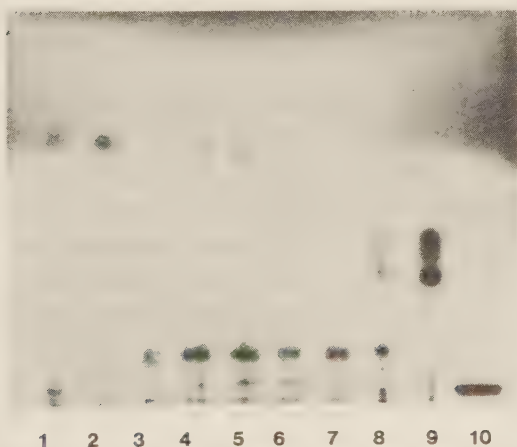


Abb. 15: Dünnschichtchromatogramm von Extrakten aus der Hämolymphe von Raupen 24 h nach der Injektion in deren Hämolymphe (Diät-Tiere). Extrakte: 3 Naturfutter-Tier (unbehandelt) 4 3-Hydroxyretinal-Injektion 5 Vitamin A-Injektion, 6 Zeaxanthin-Injektion, 7 β -Carotin-Injektion; Referenzsubstanzen: 1 Zeaxanthin, 2 β -Carotin, 8 Vitamin A, 9 Retinal*, 10 3-Hydroxyretinal* (SbCl₃/Vanillin-Färbung)

3.3.2. Injektionen in die Puppen

Für die Injektion der Retinale in die Augenregion der Puppen wurde das Injektionsvolumen auf jeweils 0,2 µl einer 28 mM Lösung des bestrahlten Retinals oder 3-Hydroxyretinals begrenzt. Die Applikation größerer Volumina ($>0,4$ µl) führte zur irreversiblen Schädigung der Augen der Imagines, im Extremfall bis zu deren völligem Fehlen. Die Injektionen bewirkten -verglichen mit den Injektionen in die Imagines- ein längeres Verweilen der injizierten Substanzen in den Versuchstieren.

Nach den Injektionen konnte kein Anstieg des Sehfarbstoffgehaltes in den Komplexaugen festgestellt werden (Abb. 14). Die Befunde waren unabhängig davon, ob die Injektionen in frisch verpuppte oder bereits kurz vor dem Schlüpfen stehende Puppen erfolgten. Die Sehfarbstoffmengen entsprachen mit $0,99 \pm 0,35$ pmol/Retina ($n=8$) für die Injektionen mit 3-Hydroxyretinal und $0,93 \pm 0,59$ pmol/Retina ($n=4$) für solche mit Retinal derjenigen Menge, die bei den unbehandelten Kontrollen ($0,82 \pm 0,45$ pmol/Retina ($n=20$)) gefunden wurden.

3.3.3. Injektionen in die Hämolymphe der Falter

Injektion in die Hämolymphe bewirkt allgemein eine Verteilung der injizierten Stoffe über den gesamten Hämolympхраum der Imagines. Auf diese Weise sollten die Carotinoide auch den Ort ihrer Wirkung -die Augen- erreichen. Da durch die "Umwälzung" der Hämolymphe immer wieder neue Moleküle an diese Stellen gelangen, sollte über einen gewissen Zeitraum ein konstanter Nachschub angenommen werden können. Die Retinale erwiesen sich bei diesen Injektionen als die für eine Erhöhung des Sehfarbstoffgehaltes wirksameren Substanzen (Abb. 16, Tab. 9). Die Injektion von jeweils 1 µl der zu testenden Lösung führte zu einem Anstieg des Sehfarbstoffgehaltes auf Werte, die über denen der unbehandelten Kontrollen lagen. Dagegen zeigten die Injektionen der Carotinoide und des Vitamins A keine Wirkung.

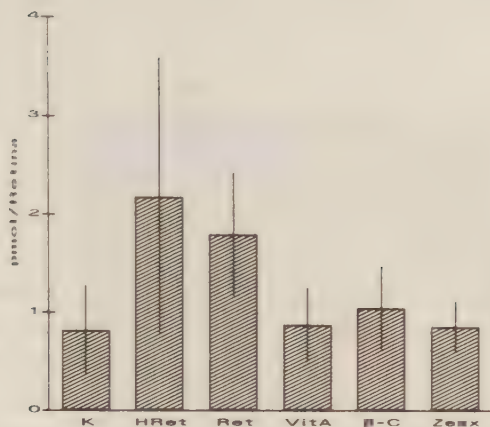


Abb. 16: Sehfarbstoffgehalt der Imagines nach Injektion in die Hämolymphe der Falter. Falter nach der Injektion im Dauerdunkel gehalten.

(K: unbehandelte Kontrolle, HRet: 3-Hydroxyretinal, Ret: Retinal, VitA: Vitamin A, β-C: β-Carotin, Zeax: Zeaxanthin)

Tab. 9: Sehfarbstoffgehalt in den Augen nach Injektion in die Hämolymphe der Imagines

	pmol/Retina	Anzahl der Einzelversuche
Retinal	$1,8 \pm 0,6$	3
3-Hydroxyretinal	$2,2 \pm 0,4$	2
Vitamin A	$0,9 \pm 0,4$	4
β-Carotin	$1,0 \pm 0,4$	4
Zeaxanthin	$0,9 \pm 0,3$	6
Kontrolle	$0,8 \pm 0,5$	20

=====

Signifikanz der Unterschiede der Mittelwerte (mit 99% Wahrscheinlichkeit verschieden, wenn $x > 2,58$)

Vergleich von	x
HRet/Ret	0,49
Ret/VitA	2,60
Ret/Zeax	2,90

3.3.4. Injektionen in die Augen der Imagines

3.3.4.1. Farbstoffinjektionen

Die direkte Applikation von Substanzen in das Auge erfolgte durch Injektionen in die "clear zone" des Komplexauges (Abb. 3). Es wurden zunächst Farbstofflösungen injiziert, um die Verteilung der injizierten Stoffe beurteilen zu können. Dabei handelte es sich um Vitalfarbstoffe, die in der Histologie gebräuchlich sind und die sicher keinen schädigenden Einfluß auf das Gewebe haben. Das Verhalten wäßriger Lösungen wurde mit einer gesättigten Lösung von Rhodamin B in Wasser und das von nicht-wäßrigen Lösungen mit einer gesättigten Lösung von Sudan III in Heptan untersucht.

Die Verteilung der injizierten Farbstoffe wurde an Kryotomschnitten (2.2.2.1.) mikroskopisch untersucht. Abbildung 17 zeigt die Fluoreszenzaufnahme eines solchen Schnittes durch ein Auge, in das drei Stunden zuvor 0,02 µl Rhodamin B-Lösung injiziert worden waren. Bereits zu diesem Zeitpunkt ist die homogene Verteilung des Farbstoffes über das gesamte Auge zu erkennen. Auch 72 Stunden nach der Injektion wurde in den Augen noch die gleiche Farbstoffverteilung wie nach drei Stunden beobachtet. Bei den Injektionen in die "clear zone" kann somit von einer homogenen Verteilung der injizierten Substanzen über das gesamte Auge ausgegangen werden.

3.3.4.2. Carotinoidinjektionen

3.3.4.2.1. Sehfarbstoffgehalt nach Injektion der Carotinoide

Für die Injektionsversuche wurden ca. 24 h alte Imagines benutzt, deren Raupen mit der Diät aufgezogen worden waren. Das Injektionsvolumen betrug jeweils 0,2 µl einer 28 mM Lösung des betreffenden Stoffes. Um Lichteinflüsse auf die injizierten Substanzen und auf die Augen auszuschließen, wurden die Versuchstiere in einigen Fällen nach der Injektion in einem lichtundurchlässigen Kasten untergebracht. Die Präparation und Extraktion der Retinae erfolgte, wenn nicht anders angegeben, 72 h nach der Injektion.

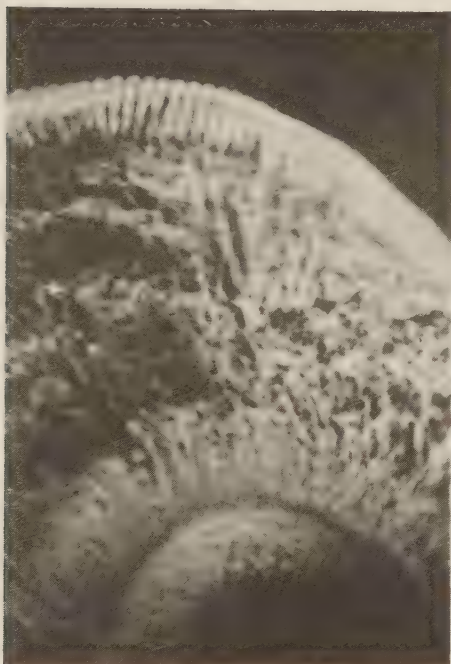


Abb. 17: Fluoreszenzaufnahme eines Kryotomschnittes nach Injektion von 0,02 μ l gesättigter Rhodamin B-Lösung. Die Präparation erfolgte drei Stunden nach der Injektion in das Auge. Die dunklen Stellen in der "clear-zone" sind auf Bearbeitungsartefakte zurückzuführen. Grüne Färbung unterhalb der Basallamina: Eigenfluoreszenz des Augengewebes; gelbe Färbung im Bereich der "clear zone" und der Rezeptoren: Fluoreszenz des Rhodamins B; orange-rote Färbung entlang der Basallamina und an Cornea und Kristallkegeln: erhöhte Farbstoffkonzentration und daraus resultierende Fluoreszenzlösung.

(Anregung durch breitbandiges UV-Licht, Betrachtung durch ein 510 nm Sperrfilter; Schnittdicke: 38 μ m, Vergrößerung: 375 fach)

Die Wirkung von Licht auf die injizierten Substanzen und daraus folgende Einflüsse auf den Sehfärbstoffgehalt, wurden durch den Vergleich von Tieren untersucht, die nach der Injektion entweder im Dauerdunkel oder in natürlichem Tag/Nacht-Rhythmus gehalten wurden.

Durch die Injektion in die "clear zone" der Superpositionsäugen gelangen die zu testenden Substanzen auf kurzen Wegen an die Stellen, an denen sie für die Sehfärbstoffsynthese benötigt werden, wodurch die Möglichkeiten metabolischer Veränderungen eingeschränkt sind.

Die Injektionen von Zeaxanthin, β -Carotin und Vitamin A bewirkten einen gleichen Anstieg des Sehfärbstoffgehaltes wie die Injektion der all-trans Isomere von Retinal und 3-Hydroxyretinal. In allen diesen Fällen war der Unterschied zu den nicht injizierten Kontrollen signifikant. Die Unterschiede zwischen der Hälterung im Tag/Nacht-Rhythmus (LD) oder im Dauerdunkel (DD) waren nicht signifikant: Die Höhe des resultierenden Sehfärbstoffgehaltes war also unabhängig von den Lichtverhältnissen, unter denen die Imagines nach der Injektion gehalten wurden. Die jeweiligen Einzelwerte für eine Testsubstanz wurden deshalb zu einem gemeinsamen Mittelwert zusammengefaßt (LD+DD). Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Tabelle 10 und Abbildung 18 dargestellt.

Auch die Injektion von Lösungen von bestrahltem all-trans Retinal (Retinal*) oder all-trans 3-Hydroxyretinal (3-Hydroxyretinal*) (s. 2.2.4.) in die Äugen führte zu einem deutlichen Anstieg des Sehfärbstoffgehaltes. Die Injektion von Retinal* bewirkte nach 72 h mit $3,34 \pm 0,78$ pmol/Retina einen höheren Sehfärbstoffgehalt als die Injektion von 3-Hydroxyretinal* ($2,3 \pm 0,53$ pmol/Retina) (Abb. 18, Tab. 10). Die durch die Injektionen maximal induzierbare Sehfärbstoffmenge beträgt somit etwa 25-30% derjenigen Menge, die bei den N-Tieren nach Aufzucht im Dauerdunkel gefunden wurde, bzw. 30-40% der Menge nach Haltung unter Lichtbedingungen.

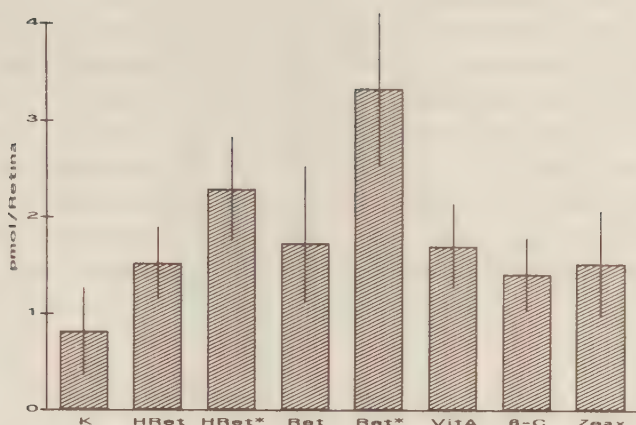


Abb. 18: Sehfarbstoffgehalt der Imagines nach Injektion in die Augen von Diät-Tieren.
(K: unbehandelte Diät-Tiere, nach Injektion von HRet: 3-Hydroxyretinal, Ret: Retinal, VitA: Vitamin A, β-C: β-Carotin, Zeax: Zeaxanthin)

Tab. 10: Sehfarbstoffgehalt nach Injektion in die Augen der Imagines

	pmol/Retina	Anzahl der Extrakte
Retinal	1,74 ± 0,6	11
3-Hydroxyretinal	1,53 ± 0,4	18
Vitamin A	1,71 ± 0,4	10
β-Carotin	1,42 ± 0,4	12
Zeaxanthin	1,53 ± 0,5	14
Kontrolle	0,82 ± 0,5	20
Retinal*	3,34 ± 0,8	11
3-Hydroxyretinal*	2,30 ± 0,5	12

Signifikanz der Unterschiede der Mittelwerte (mit 99% Wahrscheinlichkeit verschieden, wenn $x > 2,58$)

Vergleich von	x
Ret/HRet	1,03
Ret*/HRet*	3,70
Ret/Ret*	5,36
HRet/HRet*	4,37

Erfolgten die Injektionen nur in jeweils ein Auge, so konnte nach getrennter Aufarbeitung der injizierten und nicht injizierten Augen mehrerer Tiere auch ein Anstieg des Sehfärbstoffgehaltes in den nicht injizierten Augen beobachtet werden. Der Sehfärbstoffgehalt der letzteren hing sehr stark von der Art des verwendeten Retinals ab: Während nach Injektion von 3-Hydroxyretinal* der Sehfärbstoffgehalt im kontralateralen Auge durchschnittlich 85% der Menge des injizierten Auges betrug, wurden nach Injektion von Retinal* im kontralateralen Auge nur ca. 40% Sehfärbstoff gefunden.

3.3.4.2.2. Opsingehalt nach Injektion

Ergänzend zu den spektralphotometrischen Messungen wurde der Einfluß der injizierten Substanzen auf die Sehfärbstoffsynthese auch gelelektrophoretisch untersucht. Dazu wurden SDS-Extrakte von Retinae aus injizierten Augen elektrophoretisch aufgetrennt. Mit dieser Methode konnten Veränderungen im Proteinmuster oder der Intensität einzelner Proteinbanden festgestellt werden.

Das Proteinmuster von SDS-Extrakten aus Retinae von Naturfutter-(1) und Diät-Tieren (2) stimmt in beiden Fällen überein (Abb.19). Ein Unterschied besteht jedoch in der Dicke der Opsin-Bande (Pfeil), die bei den Naturfutter-Tieren viel stärker ausgeprägt ist als bei den Diät-Tieren.

Diese Extrakte dienen als Vergleich, um Veränderungen im Proteinmuster aufgrund von Injektionen festzustellen. Nach der Injektion von Retinal* in Diät-Tiere (3) ist das Proteinmuster unverändert, lediglich die Ausprägung der Opsin-Bande ist gegenüber derjenigen von nicht injizierten Tieren (2) deutlich verstärkt. Der Extrakt aus den Retinae der kontralateralen (nicht injizierten) Augen derselben Tiere (4) zeigt eine Mittelstellung der Opsin-Bande; sie ist zwar schwächer als bei den injizierten Augen, aber dennoch stärker als in den unbehandelten Kontrollen. Die Änderungen in der Stärke der Opsin-Banden stimmen gut mit den spektralphotometrisch ermittelten Daten überein (vgl. 3.3.4.2.1.)

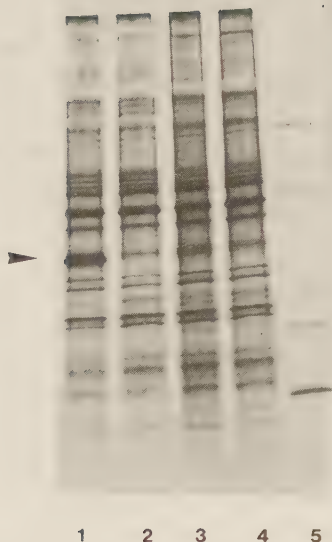


Abb. 19: Elektrophoretische Trennung von Extrakten aus Retinae von 1 Naturfutter-Tieren, 2 Diät-Tieren, 3 72 h nach Injektion von Retinal* in die Augen von Diät-Tieren, 4 kontralaterale, nicht injizierte Augen der Tiere von 3, 5 Markerproteine, (SDS-Polyacrylamidgel nach Coomassie-Färbung)

3.3.4.2.3. Chromophor nach Injektion von Carotinoiden

Die Induktion der Sehfarbstoffsynthese erfolgte nach der Injektion sowohl von Retinal als auch von 3-Hydroxyretinal. Somit besteht die Möglichkeit, daß entweder beide Retinale als Chromophor an den Sehfarbstoff gebunden werden können oder daß das Retinal vor einer solchen Bindung hydroxyliert werden muß. Die chromatographische Untersuchung von Extrakten aus Retinae, die entweder mit Retinal oder mit 3-Hydroxyretinal injiziert worden waren, sollte eine eindeutige Antwort auf diese Frage liefern.

Zunächst wurden dünnschichtchromatographische Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurden Falter benutzt, die 72 h zuvor mit Retinal* injiziert worden waren. Die Retinae wurden mit Digitonin extrahiert, und anschließend der Sehfarbstoffgehalt photometrisch

bestimmt. Der Chromophor aus dem Digitonin-Extrakt wurde auf die Dünnschichtplatten aufgetragen (2.8.). Wie die Abbildung 7b auf Spur 3 zeigt, ist nach der Injektion von Retinal, genau wie bei den Naturfutter-Tieren, 3-Hydroxyretinal in den Retinae. Dies bedeutet, daß das Augengewebe zu einer Hydroxylierung des Retinals befähigt ist.

Zur Untersuchung des Chromophors mittels HPLC wurde zunächst jeweils ein Chromatogramm eines gebleichten Extraktes aus Retinae von Naturfutter- und eines solchen von Diät-Tieren aufgezeichnet (Abb. 20 a-b, vgl. Abb. 8). Zur Identifizierung des Chromophors nach Injektion wurde, wie bei der Dünnschichtchromatographie, ein Retinaextrakt aus Augen untersucht, die 72 h zuvor mit Retinal* injiziert worden waren (0,2 µl, 28 mM).

Ein Vergleich der Retentionszeiten zeigt, daß in dem Extrakt aus den injizierten Augen (Abb. 20c) ebenso 3-Hydroxyretinal enthalten ist, wie in denen aus den Retinae der Diät- und Naturfutter-Tieren. Da ein vorher gebleichter Extrakt verwendet wurde, liegt das 3-Hydroxyretinal hauptsächlich als all-trans Isomer vor (Retentionszeit 12.25 min, vgl. Abb. 8). Die unterschiedlichen Retentionszeiten (12.33 min für das all-trans 3-Hydroxyretinal in Abb. 20a, und 12.25 min in Abb. 20b) ergeben sich durch die manuelle Injektion der Proben in das HPLC-System und sind nicht auf unterschiedliche Substanzen zurückzuführen.

Die Menge 3-Hydroxyretinal aus den injizierten Tieren übersteigt deutlich diejenige Menge, die in den Kontrollen gefunden wurde. Auch hier muß das 3-Hydroxyretinal durch Hydroxylierung des injizierten Retinals entstanden sein. Das Retinal -falls in den Extrakten noch Reste des injizierten Materials vorhanden waren- kann aufgrund der verwendeten mobilen Phase nicht identifiziert werden.

In den untersuchten Extrakten betrug der Sehfärbstoffgehalt für die Naturfutter-Tiere 15,7 pmol/Retina, für die Diät-Tiere 0,42 pmol/Retina und für die injizierten Diät-Tiere 2,5 pmol/Retina.

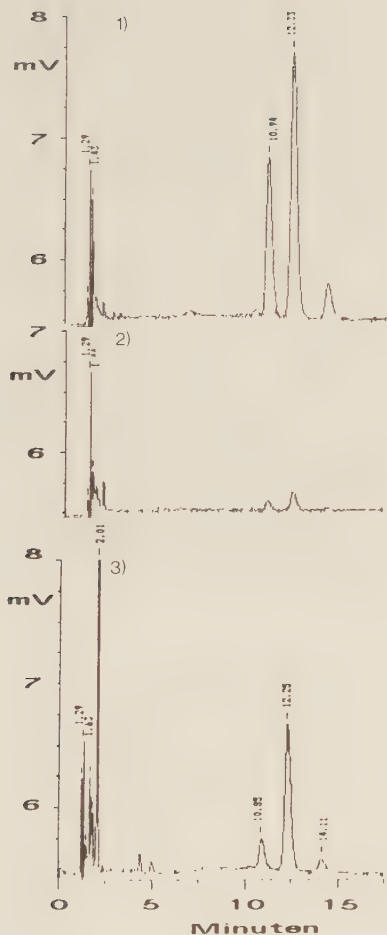


Abb. 20: Identifizierung des Chromophors in Retinaextrakten, HPLC-Chromatogramme von: 1 Naturfutter-Tieren, 2 Diät-Tieren, 3 Diät-Tiere nach Injektion von Retinal*. Vor der Extraktion des Chromophors wurde der Sehfärbstoffgehalt der Digitonin-Extrakte photometrisch bestimmt (vgl. Abb. 8). Retentionszeiten der Isomere des 3-Hydroxyretinals: 10.94 min: 13-cis; 12.35 min: all-trans; 14.21 min: 11-cis.
(mobile Phase Ether/0,5% Ethanol in Hexan (1:1), 2 ml/min)

3.3.5. Zeitabhängigkeit der Sehfarbstoffsynthese

Die Fähigkeit der Imagines von *S. littoralis* innerhalb von 72 Stunden nach Injektion von Retinalen in die Komplexaugen bis zu 40% des natürlicherweise vorhandenen Sehfarbstoffgehaltes zu synthetisieren, führte zu der folgenden Versuchsreihe, in der die zeitliche Abhängigkeit der Sehfarbstoffbildung untersucht wurde. Dabei wurde zu verschiedenen Zeiten (jeweils im Abstand von 6 Stunden) nach der Injektion von Retinal* und 3-Hydroxyretinal* der Sehfarbstoffgehalt in den Augen bestimmt. Der Sehfarbstoffgehalt nach der Injektion ist in Abhängigkeit von der Zeit in Abbildung 21 dargestellt.

Nach Injektion von 3-Hydroxyretinal* nahm der Sehfarbstoffgehalt innerhalb der ersten 24 h rasch auf ca. 60% des Maximalwertes von 2,6 pmol/Retina zu. Danach flachte die Kurve deutlich ab, stieg aber weiter über den gesamten Versuchszeitraum von 96 h leicht an. Der zu dieser Zeit erreichte Maximalwert ist niedriger als der nach Injektion von Retinal*.

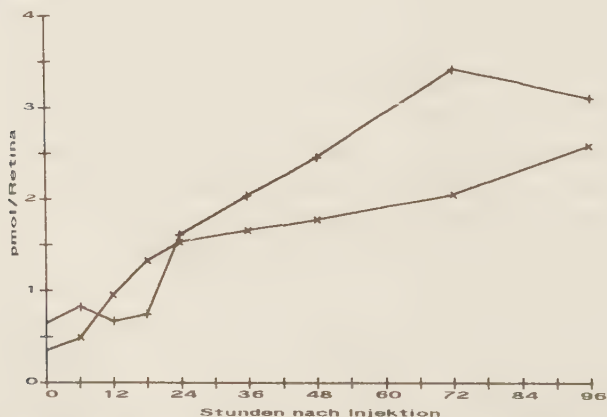


Abb. 21: Zeitliche Entwicklung des Anstieges des Sehfarbstoffgehaltes nach Injektion von Retinal* (+) und 3-Hydroxyretinal* (x) in die Augen der Imagines von Diät-Tieren.

Die Injektion von Retinal* ergab neben einer höheren Endkonzentration auch einen anderen zeitlichen Verlauf. In den ersten 18 h nach der Injektion war eine lag-Phase zu beobachten, in der keine Veränderung der Sehfärbstoffmenge erfolgte. Erst danach war ein steiler Anstieg zu verzeichnen, und 72 h nach der Injektion wurde der Maximalwert von 3,4 pmol/Retina erreicht. Bis zum Ende des Versuchszeitraumes blieb dieser Wert annähernd konstant.

3.3.6. Injektion radioaktiv markierter Aminosäuren

Mit den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, daß bei den Imagines aufgrund von Retinal-Injektionen der Sehfärbstoffgehalt gesteigert werden kann. Gleichzeitig konnte ein Anstieg der Opsinmenge im Auge beobachtet werden (3.3.4.2.2.). Zur Klärung der Frage, ob aufgrund der Retinal-Injektionen die Proteinbiosynthese von Opsin induziert oder ob bereits vorhandenes Opsin mobilisiert wird, wurden die folgenden Experimente mit radioaktiv markierten Aminosäuren durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurde 50-60 Minuten nach der Injektion von 3-Hydroxyretinal* 0,1 µl einer Lösung von ³H-markierten Aminosäuren (10 µCi/µl = 370 kBq/µl, 2.7.1.) injiziert. Die Tiere wurden anschließend im Dauerdunkel gehalten. Im Abstand von 6 Stunden wurden jeweils die Retinae von drei oder vier Tieren präpariert und für die Elektrophorese aufgearbeitet. Zur Bestimmung der in den Retina-Proteinen gebundenen Aktivität wurden von der zur Proteinbestimmung verwendeten Lösung (2.6.2.) jeweils 500 µl ($\approx$ 1,67 µl SDS-Extrakt) in einem Szintillationszähler gemessen. Abbildung 22 zeigt den zeitlichen Verlauf des Einbaus tritiiertter Aminosäuren in die Proteine. Es handelt sich dabei um den Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen. Der annähernd parallele Verlauf zur Kurve der Sehfärbstoff-Zunahme läßt auf einen direkten Zusammenhang zwischen Proteinbiosynthese und Bildung des Sehfärbstoffes schließen.

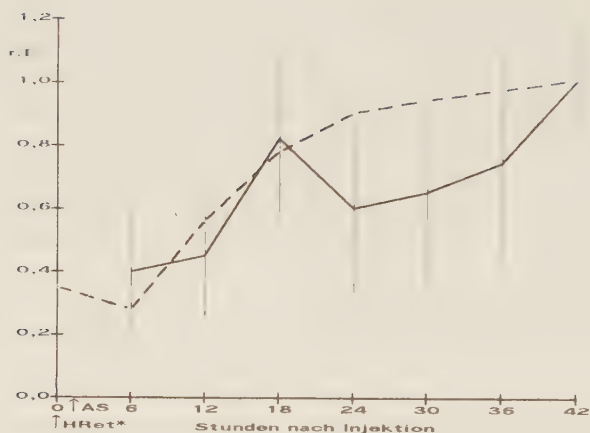


Abb. 22: Zeitliche Entwicklung des Einbaus von radioaktiv markierten Aminosäuren in die Retina nach zeitversetzter (45') Injektion von 3-Hydroxyretinal* und ^3H -markierten Aminosäuren (durchgezogene Linie). Zum Vergleich zeigt die gestrichelte Linie die Entwicklung des Sehfärbstoffgehaltes nach Injektion von 3-Hydroxyretinal* (vgl. Abb. 23, 3.3.6.). Die Kurven wurden jeweils auf den höchsten Wert bei 42 Stunden normiert.

Die Autoradiographie in Abb. 23 zeigt, daß nach den Injektionen eine Vielzahl von markierten Proteinen zu erkennen ist. Aufgrund dieser Befunde muß ein intensiver Proteinumsatz angenommen werden. Dabei wurden neben dem Opsin (Pfeil) auch andere Proteine markiert, die ebenfalls synthetisiert wurden.



Abb. 23: Autoradiogramm eines Retinaextraktes. Präparation 24h nach zeitversetzter Injektion (45') von 3-Hydroxyretinal* und ^3H -markierten Aminosäuren. Der Pfeil markiert die Schwärzung des Filmes, die durch die in das Opsin eingebauten ^3H -Aminosäuren hervorgerufen wird.
(SDS-Polyacrylamidgel, Exposition der Autoradiographie 6 Wochen)

4. Diskussion

4.1. Zuchtbedingungen

Die polyphagen Raupen von *S. littoralis* fressen unter Freilandbedingungen eine Vielzahl unterschiedlicher Pflanzen. Jedoch zeigen die Untersuchungen von DIMETRY (1972), daß nicht alle Pflanzen von den Raupen als Futter angenommen werden und daß es zwischen diesen durchaus qualitative Unterschiede gibt. Um geeignete Futterpflanzen zur Aufzucht von Naturfutter-Tieren im Labor zu finden, wurden einige leicht zu beschaffende Arten als Nahrung getestet. Alle getesteten Pflanzen (Rizinus, Löwenzahn, Tomate, Weizen) wurden von den Raupen akzeptiert, und es konnten keine wesentlichen Unterschiede in der Entwicklung der Tiere festgestellt werden. Die Höhe des Sehfärbstoffgehaltes in den Komplexaugen der Imagines war unabhängig von der Art der angebotenen Pflanze (3.1.1.).

Das Ergebnis dieser Versuche -Unabhängigkeit des Sehfärbstoffgehaltes von der Futterpflanze- entspricht den Erwartungen, da die für die Sehfärbstoffsynthese in Frage kommenden Vorstufen, die Carotinoide, in allen Pflanzen in großen Mengen vorhanden sind. Entscheidend ist demnach nicht die Art der angebotenen Pflanze, sondern deren Annahme als Futter durch die Raupen. Diese nehmen mit der Nahrung insgesamt ungefähr 0,5 mg Carotinoide auf. Die im Sehfärbstoff enthaltene Menge an Retinal beträgt ca. 8 ng pro Tier, womit der mit der Nahrung aufgenommene Überschuß an Carotinoiden ungefähr 60.000 fach ist. Diese Menge reicht in jedem Fall aus, den für eine normale Funktion des Auges benötigten Sehfärbstoff synthetisieren zu können. Dies sollte selbst unter Berücksichtigung von Schwankungen in der Zusammensetzung der Carotinoide in den verschiedenen Futterpflanzen, nur teilweiser Resorption aus dem Darm sowie für den Fall gelten, daß für jedes benötigte Retinalmolekül ein Carotinoidmolekül benötigt wird -also bei der zentralen Spaltung der C₄₀-Moleküle nicht zwei verwertbare Teile entstehen.

Die Dauer der verschiedenen Entwicklungsstadien der Versuchstiere bei den Fütterungsexperimenten im Labor stimmt mit den bei Frei-

landbeobachtungen gesammelten Daten (BISHARA, 1934) überein. Dies ist, neben der Wahl geeigneter Futterpflanzen, in erster Linie auf die hohe Umgebungstemperatur zurückzuführen, die großen Einfluß auf die Dauer der Entwicklung hat. Der Sehfärbstoffgehalt der Naturfutter-Tiere ist etwa so hoch wie bei Tieren aus Freilandfängen ($8,5 \pm 2,3$ bzw. $7,8$ pmol/Retina, Extrakt aus 9 Retinae). Die Untersuchungen haben gezeigt, daß die Tiere aus den Laborzuchten in allen für die experimentelle Arbeit relevanten Merkmalen mit den Freilandtieren übereinstimmen. Aufgrund dieser Befunde ist es gerechtfertigt, die Naturfutter-Tiere aus diesen Zuchten zur Charakterisierung des Sehfärbstoffsystems von S. litoralis zu verwenden. Der so festgestellte "Normalzustand" dient gleichzeitig als Vergleichsgrundlage für die Interpretation der Ergebnisse der Fütterungs- und Injektionsversuche.

4.2. Sehfärbstoffsystem

4.2.1. Sehfärbstoffgehalt des Wildtyps in Abhängigkeit von den Lichtverhältnissen

Die Bestimmung des Sehfärbstoffgehaltes erfolgte im allgemeinen durch Bestrahlung der Extrakte mit grünem Licht (517 nm) und anschließende Messung der Extinktionsänderungen. Das durch Belichtung des Sehfärbstoffes entstehende Metarhodopsin ist bei Raumtemperatur, bei der die meisten Messungen erfolgten, thermolabil und zerfällt nach kurzer Zeit in seine Bestandteile Chromophor und Opsin. Die Zugabe von Hydroxylamin beschleunigt diesen Vorgang, und das 3-Hydroxyretinal wird in das 3-Hydroxyretinaloxim überführt. Dies gilt nicht nur für das bei der Bleichung zur Bestimmung des Sehfärbstoffgehaltes entstehende Metarhodopsin, sondern auch für das vor der Messung in den Extrakten vorhandene Metarhodopsin. Es wird also stets der Gehalt an Rhodopsin gemessen, und der Anteil des Metarhodopsins geht nicht in die Berechnung ein. Der unter diesen Bedingungen nicht erfaßte Anteil an Sehfärbstoff kann für die Beurteilung der Versuchsergebnisse vernachlässigt werden, da erstens bei gleichen Versuchsbedingungen das Verhältnis zwischen Rhodopsin und Metarhodopsin gleich

sein sollte, und zweitens nicht der absolute Sehfarbstoffgehalt entscheidend ist, sondern dessen Veränderungen gegenüber den unter gleichen Bedingungen gehaltenen Kontrollen.

Die bei den Experimenten gefundenen Unterschiede des Sehfarbstoffgehaltes in Abhängigkeit von den Lichtverhältnissen (LD,DD) sind aufgrund der vorliegenden Untersuchungen nicht endgültig zu erklären. Es wäre denkbar, daß die Befunde auf das angewandte Verfahren der Sehfarbstoffbestimmung zurückzuführen sind, denn werden die Tiere unter Lichtausschluß (DD) gehalten, so bleibt aufgrund fehlender Umwandlung des Rhodopsins in seine Metaform der Anteil an Metarhodopsin gering. Im Gegensatz dazu liegt bei den im Licht (LD) gehaltenen Tieren jeweils ein erheblicher Teil des Sehfarbstoffes in seiner Metaform vor. Diese kann aufgrund der Empfindlichkeit der Sehfarbstoffe über den gesamten sichtbaren Spektralbereich nicht -wie dies etwa bei Calliphora möglich ist- wieder vollständig in Sehfarbstoff überführt werden. Versucht man die Metarhodopsine, die ihre Absorptionsmaxima zwischen 460 und 480 nm haben, mit blauem Licht in den Sehfarbstoff zu überführen, so wird gleichzeitig wieder Sehfarbstoff in Metarhodopsin umgewandelt. Es liegt also stets ein wellenlängenabhängiges Gleichgewicht zwischen Sehfarbstoff und seiner Metaform vor.

Die Wahrscheinlichkeit, daß die beschriebenen Befunde auf das Verfahren der Sehfarbstoffbestimmung zurückzuführen sind, ist jedoch gering, da eine Abhängigkeit des Sehfarbstoffgehaltes von den Lichtbedingungen ausschließlich bei den Naturfutter-Tieren auftritt. Im Gegensatz dazu gibt es bei den Zeaxanthin-Tieren mit einem ähnlich hohen Sehfarbstoffgehalt keine signifikanten Unterschiede im Sehfarbstoffgehalt nach LD- oder DD-Hälterung. Dies wäre aber bei Anwendung der gleichen Meßmethode zu fordern. Eine Reduktion des Sehfarbstoffes aufgrund von Schädigungen der Retina -wie sie für die Mutante beobachtet wurden- kommt ebenfalls nicht in Betracht, da bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen (ANTON-ERXLEBEN & LANGER, 1987) von Naturfutter-Tieren, die im Licht (LD) gehalten wurden, ein vollkommen intaktes Rhabdom gefunden wurde. Außerdem hätte bei den Zeaxanthin-Tieren unter

gleichen Bedingungen ein ähnlicher Rückgang der Sehfarbstoffmenge auftreten müssen.

Ein nahrungsbedingter Einfluß als Ursache für die Unterschiede im Sehfarbstoffgehalt kann dagegen nicht ausgeschlossen werden. Es ist denkbar, daß mit der Nahrung aufgenommene Moleküle bei Lichteinwirkung im Auge Reaktionen begünstigen, die eine Reduktion des Sehfarbstoffgehaltes bewirken. Sie könnten als "sensitizer pigments" fungieren und zur Bildung reaktiver Photoprodukte beitragen (SKOLNIK, 1987), die dann ihrerseits für den zu beobachtenden Rückgang des Sehfarbstoffgehaltes verantwortlich sind. Eine Überprüfung dieser Hypothese ist aber nur durch eine Serie von Fütterungsexperimenten möglich. Zu diesem Zweck müssen der Zeaxanthin-Diät verschiedene Fraktionen aus Pflanzenextrakten zugegeben werden, um anschließend die Lichteinflüsse zu testen. Eine andere Möglichkeit besteht in veränderten Absorptionseigenschaften der Sehfarbstoffextrakte aufgrund von Membran- oder Protein gebundenen Pflanzeninhaltsstoffen, die -je nach Lichteinwirkung- die beobachteten Unterschiede im Sehfarbstoffgehalt "vortäuschen".

4.2.2. Die Sehfarbstoffe

Für die Untersuchung der Sehfarbstoffe wurde davon ausgegangen, daß im Auge von S. littoralis ein ähnliches System zu finden ist, wie es für S. exempta beschrieben wurde (LANGER et al., 1979). Um das Sehfarbstoffsystem zu charakterisieren, wurden die Extrakte mit verschiedenen Wellenlängen sukzessiv gebleicht und dadurch die Sehfarbstoffe im Extrakt nachgewiesen. Es war -wie auch bei S. exempta- nicht möglich einen für rotes Licht empfindlichen Sehfarbstoff zu messen. Das Vorhandensein dieses Rezeptortyps konnte von Frau Dr. D. Zimmermann jedoch aufgrund elektronenmikroskopischer Untersuchungen nach Bestrahlung mit langwelligem Licht nachgewiesen werden (Technik vgl. MEINECKE & LANGER, 1984). Einen Querschnitt durch den basalen Teil eines Rhabdoms nach einer solchen Belichtung zeigt Abbildung 24. Der durch die Belichtung erzielte Effekt gleicht demjenigen, der bei der schirmpig

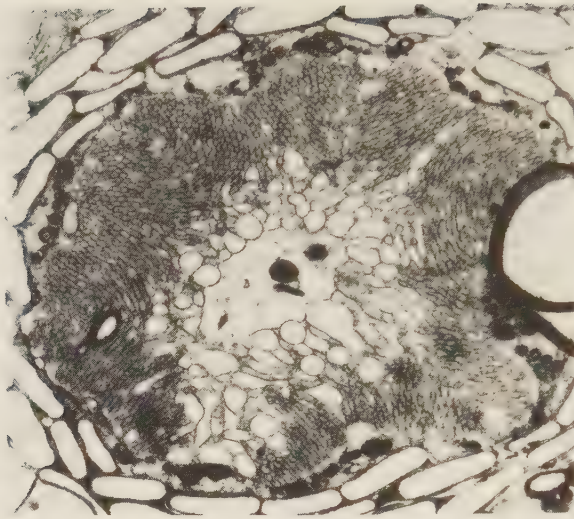


Abb. 24: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Querschnittes durch den basalen Teil eines Rhabdoms von *S. littoralis*. Die zentrale Retinulazelle, die den rotempfindlichen Sehfärbstoff enthält, zeigt die typische durch Belichtung mit langwelligem Licht (620 nm) verursachte Schädigung.
(Vergrößerung 14.000fach, EM-Aufnahme Dr. D. Zimmermann)

mentarmen Mutante am intakten Auge auftritt. Die in der Mitte befindliche Retinulazelle, die den rotempfindlichen Sehfärbstoff enthält, weist die typische, durch Lichteinfluß induzierte Schädigung der Rhabdomerstruktur auf. Die benachbarten Zellen mit dem grünempfindlichen Sehfärbstoff zeigen keine Reaktion auf die Belichtung. Die in Abb. 25 dargestellten Nomogramme der drei im Extrakt gefundenen Sehfärbstoffe verdeutlichen, daß der grüne Sehfärbstoff in dem für die Belichtung benutzten Wellenlängenbereich oberhalb 600 nm nur noch geringe Absorption besitzt und deshalb eine Schädigung durch absorbiertes Licht unterbleibt.

Die Proteinkomponente des Sehfärbstoffmoleküls, das Opsin, liegt mit einem Molekulargewicht von etwa 40.000 im oberen Bereich der für Insekten beschriebenen Werte (STAVENGA & SCHWEMER, 1984). Für die Fliege (*Calliphora erythrocephala*) wird ein Molekulargewicht

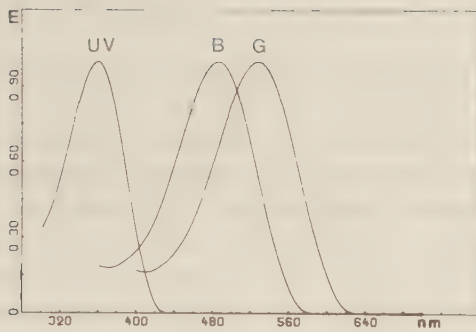


Abb. 25: Nomogramme der drei in den Extrakten gefundenen Sehfärbstoffe (vgl. Abb. 5).

von 32.500 und für Moskitos (Aedes aegypti) eines von 39.000 angegeben.

Nach Veröffentlichung der Arbeiten von VOGT (1983, 1984) über einen neu entdeckten Chromophor des Sehfärbstoffes und dessen Verbreitung in unterschiedlichen Insektengruppen wurden verschiedene Arten auf das Vorhandensein von 3-Hydroxyretinal untersucht (SEKI, 1986, 1987). Es wurde von den genannten Autoren im Sehfärbstoff aller bisher untersuchten Spezies der Lepidopteren, Dipteren, Neuropteren und Hemipteren gefunden. Bei Coleopteren und Odonaten ist bei einigen Arten sowohl Retinal als auch 3-Hydroxyretinal vorhanden. Der Nachweis von 3-Hydroxyretinal als Chromophor des Sehfärbstoffes bei der Gattung Spodoptera fügt sich also in dieses System ein.

In Anlehnung an die von VOGT (1983) vorgeschlagene Terminologie bei Sehfärbstoffen mit 3-Hydroxyretinal als Chromophor von Xanthopsinen und Metaxanthopsinen zu sprechen, ist auch der Sehfärbstoff von Spodoptera als Xanthopsin zu bezeichnen. Diese Namensgebung für 3-Hydroxyretinal enthaltende Sehfärbstoffe ergänzt das bisherige System, bestehend aus den auf dem Retinal basierenden Rhodopsinen, und den das 3-Dehydroretinal enthaltenden Porphyr-

opsinen.

4.2.3. Sehfarbstoffgehalt der Mutante in Abhängigkeit von den Lichtverhältnissen

Die bei der gelbäugigen Mutante von S. littoralis aufgetretenen Unterschiede im Sehfarbstoffgehalt in Abhängigkeit von den Lichtverhältnissen zeigen eindrucksvoll die zerstörende Wirkung von Licht, selbst in dem Spektralbereich über 400 nm. Durch die Reduktion der Schirmpigmente auf einen sehr niedrigen Gehalt (<5%) kann das Licht fast ungeschwächt auf die Rezeptormembranen treffen. Die Folge ist die Zerstörung des Rhabdoms, die sich im Auftreten von multilamellaren Körpern und großen Mengen an rauhem Endoplasmatischem Retikulum äußert (ANTON-ERXLEBEN & LANGER, 1987) (Abb.24). Die morphologische Veränderung ist mit einem drastischen Rückgang der Sehfarbstoffkonzentration verbunden. Ein Beweis dafür, daß diese Veränderungen tatsächlich auf Lichtwirkung basieren, ist die Beobachtung, daß Naturfutter-Tiere der Mutante einen ähnlich hohen Sehfarbstoff aufweisen wie der Wildtyp, wenn die Imagines vom Puppenstadium an im Dauerdunkel gehalten werden. Das Rhabdom zeigt unter diesen Bedingungen eine normale Struktur.

Die hohe Lichtempfindlichkeit ist nicht nur bei den Naturfutter-Tieren mit den hohen Sehfarbstoffgehalten festzustellen, sondern auch, in abgeschwächter Form, bei den Diät-Tieren. Beim Wildtyp reagieren die Rezeptorzellen aufgrund von Lichteinwirkung ebenfalls mit morphologischen Veränderungen. Unter physiologischen Lichtverhältnissen sind die zu beobachtenden Anschwellungen jedoch gering und reversibel. Das Anschwellen der Mikrovilli wurde dazu benutzt, die Verteilung der verschiedenen Sehfarbstoffe auf die unterschiedlichen Rhabdomere festzustellen (MEINECKE & LANGER, 1984).

Ähnliche Ergebnisse sind auch von Stark (STARK & CARLSON, 1984) bei einer weißäugigen Mutante von Drosophila für die Rezeptoren

R1-6, sowie von Kirschfeld (KIRSCHFELD & HARDIE, 1988) für die 7y Rezeptorzelle bei den Fliegen Musca und Calliphora erhalten worden. Hier scheinen jedoch zwei unterschiedliche Mechanismen vorzuliegen: die Untersuchungen von Stark zeigen eine abnehmende Schädigung der Rezeptoren mit abnehmender Carotinoidkonzentration in der Nahrung, Kirschfeld macht die entgegengesetzten Beobachtungen. Er stellt fest, daß die Membranen der 7y-Rezeptorzellen durch eingebaute C40-Carotinoide vor der zerstörenden Wirkung von Licht geschützt werden.

Die bei der Mutante von S. littoralis aufgetretenen Schädigungen scheinen eher zu dem von Stark beobachteten Typ zu gehören. Denn auch die hier erhaltenen Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß mit abnehmendem Carotinoidgehalt der Nahrung (und damit einer Reduktion der Sehfärbstoffkonzentration) die Schädigung schwächer wird (Abb. 13). Das Ausmaß der Schäden und die hohe Empfindlichkeit, auch gegenüber sehr schwachen Lichtreizen (selbst das zur Präparation benutzte Rotlicht rief bei den N-Tieren schon deutliche Veränderungen in der Rhabdomstruktur hervor, ANTON-ERXLEBEN, pers. Mitteilung), ist wohl auf die besondere Bauweise der Superpositionsaugen zurückzuführen. Für dämmerungs- und nachtaktive Tiere wie S. littoralis ist ein sehr lichtempfindliches Auge zur Ausnutzung des Restlichtes von großer Bedeutung. Wird nun ein solch empfindliches Auge hohen Lichtintensitäten ausgesetzt, so können normalerweise die Schirmpigmente einen großen Teil des einfallenden Lichtes von den Rhabdomen fernhalten und so Schäden verhindern. Dies ist bei der Mutante aufgrund der reduzierten Schirmpigmentmenge nicht möglich.

Veränderungen an den Rezeptorzellen aufgrund von Lichteinwirkung wurden auch an dem Polychaeten Nereis limnicola (EAKIN & BRANDENBURGER, 1985) und dem Hummer Nephros norvegicus (SHELTON et al, 1985) untersucht. Bei Wirbeltieren gibt es ebenfalls Studien über die schädigende Wirkung von Licht auf die Retina. Hier sind vor allem die Untersuchungen an Albinoratten zu nennen (WHITE & FISHER, 1987).

Der molekulare Mechanismus, der zu den lichtinduzierten Schädigungen

gungen führt, bleibt in allen genannten Arbeiten letztlich ungeklärt. Mögliche Erklärungsversuche (WHITE & FISHER, 1987) reichen von einer Schädigung der Zellen durch Strahlungswärme über Anhäufung von toxischen Photoprodukten (Peroxide), Veränderung der Membranlipide und übermäßige Beanspruchung des Stoffwechselapparates bis zu einer Fehlfunktion des Pigmentepithels.

Aufgrund der vorliegenden Befunde muß bei Spodoptera von einer direkten Beteiligung der Sehfärbstoffmoleküle an den lichtinduzierten Schädigungen ausgegangen werden, da das Ausmaß der Schäden mit abnehmendem Sehfärbstoffgehalt abnimmt. Eine Hitzeschädigung kann ausgeschlossen werden, da hierfür die Absorption von z.B. langwelligem Licht geringer Intensität (schwaches Rotlicht) nicht ausreicht, um die beobachteten Veränderungen zu erklären. Auch das rasche Auftreten der Schäden nach einer Belichtung spricht für eine Beteiligung des Sehfärbstoffes und gegen z.B. Veränderungen des Stoffwechsels oder die Anhäufung von toxischen Photoprodukten.

4.3. Fütterungsexperimente

Die im ersten Teil dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen zum Sehfärbstoffsystem von S. littoralis beschreiben einerseits den "Normalzustand" bei naturähnlichen Aufzuchtbedingungen und andererseits den Mangelzustand nach Aufzucht mit der Diät (vgl. CARLSON et al., 1967). Anhand der Fütterungsexperimente wurde zunächst bestimmt, welche für die Sehfärbstoffsynthese benötigten Vorstufen von den Raupen aus der Nahrung resorbiert werden können.

Wie die Untersuchungen zur Charakterisierung des Chromophors ergaben, handelt es sich unter "Normalbedingungen" bei diesem um das 3-Hydroxyretinal. Dessen Synthese, sowie die seiner Vorstufen, ist den Insekten -ebenso wie allen anderen Tieren- nicht möglich. Da aber für die Sehfärbstoffsynthese das 3-Hydroxyretinal oder eine entsprechende Vorstufe benötigt werden, ergibt sich das Problem, aus der Nahrung geeignete Moleküle in den Körper zu

überführen. Den Tieren stehen dazu in der Nahrung eine Vielzahl unterschiedlicher Substanzen zur Verfügung. Aus diesem Angebot müssen dem Organismus alle für das Überleben notwendigen Stoffe zugeführt werden. Dabei könnte eine Auswahl getroffen werden, um den aufwendigen Transport in den Körper nur den tatsächlich benötigten Substanzen zu ermöglichen. Mit der gewählten Versuchsanordnung war es durch Zugabe verschiedener Carotinoide zur Nahrung möglich, die Aufnahme und Wirkung dieser Substanzen gezielt zu untersuchen.

Es konnte gezeigt werden, daß die Raupen von S. littoralis mit einer nahezu Vitamin A-freien Diät aufgezogen werden können, ohne daß die Tiere erkennbare Mangelercheinungen aufweisen. Der einzig erkennbare Unterschied zu den Naturfutter-Tieren ist die beabsichtigte Verringerung des Sehfarbstoffgehaltes in den Augen der Imagines. Die Sehfarbstoffgehalte nach Fütterung mit der Diät oder Naturfutter führen zu den beiden Extremwerten. Die Diät-Tiere enthalten mit einem Sehfarbstoffgehalt von 0,24 pmol/Retina ein Minimum an Rhodopsin und sind die Ausgangsbasis, um Veränderungen durch Fütterung oder Injektion zu untersuchen. Die relativ hohe Standardabweichung von 0,2 pmol/Retina ist auf Schwankungen im Carotinoidgehalt der Weizenkeime zurückzuführen, die bei den verschiedenen Chargen aufgetreten sind.

Durch Zugabe der zu untersuchenden Carotinoide zu der Diät und durch Vergleich der resultierenden Sehfarbstoffgehalte mit den beiden Eckwerten läßt sich eine eindeutige Aussage über den physiologischen Wert der betreffenden Stoffe machen. Je mehr sich der Sehfarbstoffgehalt demjenigen der Naturfutter-Tiere nähert, um so effektiver kann das untersuchte Molekül vom Organismus verwertet werden.

Die Auswahl der untersuchten Carotinoide erfolgte unter Berücksichtigung folgender Gesichtspunkte: Da der Chromophor verschiedener Insekten-Ordnungen das 3-Hydroxyretinal ist, war klar, daß ein hydroxyliertes Derivat des Vitamins A für die Sehfarbstoffsynthese zur Verfügung stehen muß. Dem Organismus bietet sich die Möglichkeit, hydroxylierte Substanzen (Xanthophylle) aus der Nah-

rung aufzunehmen. Zeaxanthin trägt am C3- und C3'-Atom der β -Iononringe jeweils eine Hydroxylgruppe. Bei Spaltung des Moleküls entstehen zwei 3-Hydroxy-Vitamin A-Moleküle, die für die Sehfärbstoffsynthese verwendet werden können. Die andere Möglichkeit besteht in der Aufnahme nicht hydroxylierter Moleküle (Carotine) wie z.B. des β -Carotins, um diese dann im Körper zu hydroxylieren. Da auch bei den Dipteren β -Carotin als Vorstufe für den Chromophor verwendet werden kann (VOGT & KIRSCHFELD, 1983, 1984), lag es nahe, auch bei Spodoptera die Wirksamkeit von β -Carotin zu testen. Zusätzlich zu diesen beiden Molekülen wurden Retinolacetat und Vitamin A, als direkte Vorläufer der Retinale, untersucht.

Die Ergebnisse der Fütterungsversuche zeigen, daß nur die Zugabe von Zeaxanthin eine Anhebung des Sehfärbstoffgehaltes in den Augen bewirkt. Alle anderen Substanzen führen bei den Versuchstieren zu keinen Veränderungen gegenüber den Diät-Tieren. Der Grund für diese Ergebnisse konnte in der fehlenden Resorption des β -Carotins, in der Unfähigkeit diese Substanzen zu verwerten oder in Veränderungen des β -Carotins in der Diät zu suchen sein.

Die Analyse der Diät ergab keine Veränderungen der zugegebenen Carotinoide aufgrund von thermischer Zersetzung während der Zubereitung oder aufgrund chemischer Reaktionen mit Bestandteilen der Diät. Auch die Lagerung der Diät hatte keinen Einfluß auf die darin enthaltenen Carotinoide (3.2.5.). Es kann daher ausgeschlossen werden, daß der Grund für den fehlenden Anstieg des Sehfärbstoffgehaltes in der Zusammensetzung oder den Bestandteilen der Diät zu suchen ist.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist die mangelnde Fähigkeit der Raupen diese Substanzen aus der Nahrung zu resorbieren. Hinweise auf diese Möglichkeit sind in der Literatur zu finden (KAYSER, 1982). Deshalb wurde den Raupen im letzten Larvenstadium Hämolymphe entnommen und auf ihren Carotinoidgehalt hin untersucht. Die Konzentration der Carotinoide in der Hämolymphe der Raupen, die mit Zeaxanthin-Diät gefüttert waren, entsprach etwa derjenigen der Naturfutter-Tiere. Nach Fütterung mit Vitamin A-

oder β -Carotin-Diät entsprachen diese Werte denen der Diät-Tiere, also nur etwa 10% der bei den Naturfutter-Tieren gefundenen Mengen. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß die Resorptionsfähigkeit für Zeaxanthin sehr viel größer ist als für β -Carotin oder Vitamin A.

Es könnte somit bei der Resorption von Zeaxanthin (oder allgemein von Xanthophyllen) ein Mechanismus vorliegen, der auf eine bevorzugte Aufnahme hydroxylierter Carotinoide ausgerichtet ist oder einen weitgehenden Ausschluß nicht benötigter oder unwirksamer Substanzen ermöglicht. Eine solche Einschränkung in der Ausnutzung unterschiedlicher Nahrungsbestandteile hat für die Raupen sowohl Vor- als auch Nachteile. Die Vorteile liegen darin, daß nur solche Substanzen in den Körper gelangen, die entweder benötigt oder verwertet werden können:

Die Strategie der selektiven Aufnahme von Vorstufen benötigter Moleküle ist aus ökonomischer Sicht durchaus sinnvoll. Die für die Sehfärbstoffsynthese benötigten Xanthophylle sind in den Futterpflanzen in ausreichender Menge vorhanden, so daß auf den aufwendigen Prozess der Hydroxylierung von Carotinen verzichtet werden kann. In grünen Pflanzenteilen, die den Raupen als Nahrung dienen, stellen die Xanthophylle mit einem oder zwei hydroxylierten β -Ring $\bar{e}$ n bis zu 50% des Gesamtcarotinoidgehaltes (TAKAGI, 1985). Dieser große Überschuß an potentiellen Vorstufen kompensiert gleichzeitig den Nachteil, den eine allzu große Spezialisierung mit sich bringt.

Der Umstand, daß auch eine geringe Menge β -Carotin in der Hämolymphe nachweisbar ist, legt die Vermutung nahe, daß der Aufnahmemechanismus für Xanthophylle (hydroxylierte Carotinoide) auch eine gewisse unspezifische Durchlässigkeit für Carotine besitzt. Die bloße Unterversorgung mit unhydroxylierten Vorstufen scheint aber nicht der alleinige Grund für die geringen Sehfärbstoffgehalte nach Fütterung mit β -Carotin-Diät zu sein. Vielmehr muß neben der Unterversorgung noch ein Engpaß bei der Speicherung oder -bei den Carotinen- der Hydroxylierung dieser Moleküle bestehen. Die fehlende Fähigkeit zur Aufnahme von Carotinen als Vorstufen

für den Chromophor steht im Gegensatz zu den bei der Schmeißfliege *Calliphora* gemachten Beobachtungen. Diese sind offensichtlich in der Lage mit der Nahrung aufgenommenes β -Carotin zu hydroxylieren. Diese Fähigkeit der Fliegen steht in Verbindung mit deren Lebensweise. Die Maden von *Calliphora* leben in faulendem Fleisch (Laborzuchten auf Herz oder Leber). Der tierische Organismus enthält jedoch nur geringe Mengen an Xanthophyllen, und so stehen nur Vitamin A oder β -Carotin als Vorstufen für den Chromophor des Sehfarbstoffes zur Verfügung. Die Fähigkeit zur Hydroxylierung ist also notwendig, um die mit der Nahrung aufgenommenen Moleküle in eine für den Einbau in den Sehfarbstoff geeignete Form bringen zu können. Eine befriedigende Antwort auf die Frage, warum die Fliegen (oder auch andere Insekten) das 3-Hydroxyretinal als Chromophor des Sehfarbstoffes benutzen, läßt sich nach bisherigem Kenntnisstand nicht geben.

4.4. Injektionsexperimente

Wie im ersten Teil dieser Arbeit gezeigt werden konnte, müssen die Raupen die für die SehfARBstoffsYnthese benötigten Vorstufen in Form hydroxylierter Carotinoide aus der Nahrung aufnehmen. Aufgrund der Untersuchungen des Chromophors ist weiterhin bekannt, daß es sich bei diesem um das 3-Hydroxyretinal handelt. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse ergaben sich für die Injektionsversuche folgende Fragestellungen: Was geschieht, wenn nicht hydroxylierte Carotinoide in unterschiedliche Entwicklungsstadien injiziert werden? Ist auch nach der Injektion von Retinal das 3-Hydroxyretinal als Chromophor der SehfARBstoffe vorhanden?

4.4.1. Injektionen in die Raupen

Die Injektion von Carotinoiden in die Hämolymphe der Raupen erlaubte die Wirkung auch solcher Substanzen zu testen, die aus der Nahrung nur schlecht oder vielleicht gar nicht resorbiert werden können, und deshalb im Normalfall keinen Einfluß auf die SehfARBstoffsYnthese haben. Die Auswertung der Versuche zeigt, daß die Injektionen von β -Carotin oder Zeaxanthin einen gleich hohen Anstieg des SehfARBstoffgehaltes -von 0,8 pmol/Retina (bei den Kontrollen) auf 1,8 pmol/Retina- bewirken, wohingegen die Injektionen der Retinale keinen signifikanten Anstieg der SehfARBstoffe induzierten (1,1 pmol/Retina). Der SehfARBstoffgehalt in den mit Zeaxanthin injizierten Tieren blieb damit hinter den aufgrund der Fütterungsversuche erwarteten Werten zurück; dagegen war der Anstieg nach der Injektion von β -Carotin aufgrund der Erkenntnisse aus den vorangehenden Experimenten nicht erwartet worden.

Die Ergebnisse dieser Injektionsversuche zeigen zunächst, daß β -Carotin als Vorstufe für die SehfARBstoffsYnthese nicht grundsätzlich ungeeignet ist. Es kann aber offensichtlich nur dann wirksam werden, wenn es in einer genügend hohen Konzentration in der Hämolymphe vorhanden ist, denn die Aufzucht der Raupen mit der β -Carotin-Diät hatte keine Steigerung des niedrigen SehfARBstoffgehaltes (3.2.3./3.2.5.) zur Folge. Da aber auch die Injek-

tion von Zeaxanthin in die Raupen nur zu einem geringen Anstieg der Sehfärbstoffmenge führt, kann die den Versuchstieren zur Verfügung stehende Menge nicht allein ausschlaggebend für einen hohen Sehfärbstoffgehalt in den Imagines sein (es wurde ein etwa 2100facher Überschuß injiziert). Die Befunde deuten vielmehr darauf hin, daß die Form der Applikation einen Einfluß auf die Wirksamkeit der betreffenden Substanzen hat.

Die Injektionen erfolgten in das letzte Raupenstadium, und in jede der Raupen konnte aus technischen Gründen nur einmal injiziert werden (sie müssen eine Mindestgröße haben; mehrmalige Injektionen senken die Vitalität bzw. führen zum Tod der Raupen). Bei dieser Vorgehensweise wurde den Raupen mit einer Injektion die gesamte -weit mehr als zum Aufbau eines "normalen" Sehfärbstoffgehaltes notwendige- Menge an Carotinoiden verabreicht. Diese Form der Applikation steht in krassem Gegensatz zu der unter natürlichen Bedingungen erfolgenden Versorgung mit diesen Substanzen. Bei der Aufnahme der Vorstufen aus der Nahrung werden sie den Raupen während der gesamten Freßphase zugeführt. Die Raupen können dann langsam, aber kontinuierlich ihre Speicher -Fettkörper (WEBER & WEIDNER, 1974)- mit diesen Substanzen auffüllen.

Der geringe Anstieg des Sehfärbstoffgehaltes nach einer einmaligen Applikation läßt auf einen limitierenden Mechanismus beim Transport dieser Moleküle in der Hämolymphe zum Speicher oder bei der Speicherung selbst schließen. Dies kann einerseits auf die relativ kurze Zeit zwischen Injektion und Verpuppung zurückzuführen sein (1-3 Tage), so daß nicht ausreichend Zeit zu Verfügung steht, um die Vorstufen in einer geeigneten Form zu speichern. Andererseits kann aber auch die Transportkapazität eventueller Carriermoleküle (ähnlich den retinol-binding proteins), die die Vorstufen zu den Speichern hin befördern, durch den plötzlichen Anstieg der Carotinoidkonzentration schnell ausgelastet sein. Weiterhin besteht die Möglichkeit, daß diese Carrier oder die für die "Weiterverarbeitung" benötigten Moleküle (z.B. Enzyme) erst durch die Anwesenheit des Substrates induziert werden. Dies würde, unter Berücksichtigung des Zeitfaktors, auch den ge-

ringen Anstieg des Sehfärbstoffgehaltes nach Injektion von Zeaxanthin in die Raupen verständlich machen.

Die elektrophoretische Untersuchung der in der Hämolymphe vorhandenen Proteine zeigt an einigen Stellen deutliche Unterschiede zwischen der aus Diät- und Naturfutter-Tieren gewonnenen Hämolymphe (3.3.1.2., Abb. 12). Dies ist ein Indiz dafür, daß einige Proteine in Abhängigkeit von der Nahrung in unterschiedlicher Menge vorhanden sind. Dabei könnte es sich durchaus um die für die oben postulierten Aufgaben in Frage kommenden Moleküle handeln.

Die Injektionsversuche in die Hämolymphe der Raupen ergeben zusammenfassend folgendes Ergebnis: Während des Raupenstadiums sind die Carotinoide (und dabei in erster Linie die Xanthophylle) die für die Bildung des Sehfärbstoffes in den Imagines relevanten Moleküle. Diese Moleküle müssen über einen gewissen Zeitraum (länger als nach den Injektionen zur Verfügung steht) und mit einer gewissen Mindestkonzentration (für β -Carotin höher als durch Resorption über den Darm erreichbar) in der Hämolymphe vorhanden sein. Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen zeigen β -Carotin und Zeaxanthin die gleiche Wirkung.

4.4.2. Injektionen in die Puppen

Wie vorstehend gezeigt, hat neben der Konzentration auch die Verweildauer der Carotinoide im Versuchstier Einfluß auf den Sehfärbstoffgehalt in den Imagines. Da eine Verlängerung des Raupenstadiums (etwa durch Herabsetzung der Temperatur oder Futterentzug) nicht sinnvoll erschien und bei den Injektionen in Hämolymphe und Augen der Imagines ähnliche Zeiteinfüsse wie bei den Raupen festgestellt wurden, sind auch Injektionen in die Puppen vorgenommen worden. Durch diese sollte eine Verlängerung des Zeitraumes zwischen Injektion und Versuchsende (der Bestimmung des Sehfärbstoffgehaltes) erreicht werden, während bei den Injektionen in die Imagines im allgemeinen 72 h zwischen Injektion und Präparation lagen. Durch Verlegung des Versuchsbeginns in das

vorherige Entwicklungsstadium betrug diese Zeitspanne 5-10 Tage. Jedoch konnte auch dadurch der Sehfärbstoffgehalt in den Augen der Imagines gegenüber den Kontrollen nicht signifikant erhöht werden. Er blieb noch deutlich hinter demjenigen zurück, der nach Injektionen in die Augen erreicht wurde.

Der Zeitpunkt der Injektionen (frische Puppen oder solche, die kurz vor dem Ausschlüpfen der Imagines standen) hatte ebensowenig Einfluß auf das Ergebnis der Experimente, wie die Art der injizierten Retinale (Retinal oder 3-Hydroxyretinal). Damit kann eine zeitlich begrenzte Empfindlichkeit der Puppen für die Induktion der Sehfärbstoffsynthese ausgeschlossen werden. Auch eine Bevorzugung des 3-Hydroxyretinals (als natürlichem Chromophor) gegenüber dem Retinal konnte nicht beobachtet werden. Das Ausbleiben eines Anstiegs des Sehfärbstoffgehaltes aufgrund der Injektionen ist wahrscheinlich auf entwicklungsphysiologische Ursachen zurückzuführen: Während der Puppen"ruhe" finden umfangreiche Veränderungen bei der Entwicklung zur Imago statt. Auf dieser empfindlichen Entwicklungsstufe haben äußere Einflüsse -zu denen auch die Injektionen zählen- häufig tiefgreifende Folgen. Beispiele dafür sind die beobachteten Defekte oder das Fehlen von Augen bei den Imagines.

4.4.3. Injektionen in die Hämolymphe der Falter

Mit der Injektion der Carotinoide in die Hämolymphe der Imagines wurden die zu testenden Substanzen bereits in das voll entwickelte Tier appliziert. Die Stoffe werden mit der Hämolymphe mehr oder weniger gleichmäßig über das gesamte Tier verteilt. Durch diese Versuchsreihe sollte geklärt werden, ob die Transportform der Vorstufen wie bei den Raupen die Carotinoidmoleküle sind, oder ob bei den Imagines die Retinale diese Rolle übernehmen.

Die Ergebnisse weisen auf ein Umschalten des Organismus auf eine andere Transportform hin. Die Retinale sind in dieser Phase der Entwicklung wesentlich wirksamer als die Carotinoide, die hier keine Erhöhung des Sehfärbstoffes mehr bewirken (Tab. 8,

Abb. 16). Die Zunahme der Sehfärbstoffkonzentration nach der Injektion der Retinale ist jedoch nicht so hoch wie nach der direkten Injektion in die Augen.

Auch hier kann einer der Gründe für die geringe Zunahme des Sehfärbstoffgehaltes in der Versuchsdurchführung liegen. Die zu verabreichenden Substanzen konnten nur jeweils einmal injiziert werden. Bei zwei- oder mehrmaligen Injektionen war die Überlebensquote der Versuchstiere so gering, daß auf diese Versuchsreihe verzichtet wurde. Der Verbleib der injizierten Substanzen konnte nicht verfolgt werden; es kann aber wohl von einer gleichmäßigen Verteilung dieser Stoffe mit der Hämolymphe ausgegangen werden. Die injizierten Mengen, die rein rechnerisch einen ≈ 2100 -fachen Überschuß darstellen, sind die gleichen, die bei den Injektionen in die Raupen verwendet wurden. Eine Erhöhung der injizierten Menge ($>> 1 \mu\text{l}$ Injektionslösung oder die Erhöhung der Konzentration der Lösung) führte ebenfalls zum raschen Tod der Versuchstiere.

Trotz dieser Einschränkungen läßt sich feststellen, daß in den Imagines die Retinale diejenigen Moleküle sind, die einen Anstieg des Sehfärbstoffgehaltes bewirken. Normalerweise werden diese wohl aus den während der Larvalentwicklung mit Carotinoiden aufgefüllten Speichern (Fettkörper) als Retinoide freigesetzt und dann -möglicherweise mit Carriern- zu ihrem Wirkort transportiert. Da auch hier denkbar ist, daß diese Carrier-Moleküle erst durch die Anwesenheit der "Substrat"-Moleküle induziert werden, könnte darin eine Erklärung für den relativ geringen Anstieg des Sehfärbstoffgehaltes nach den beschriebenen Injektionen liegen.

4.4.4. Injektionen in die Augen

Mit der Injektion der Carotinoide in die Superpositionsaugen der Imagines werden als letzte Stufe der Versuchsreihe die zu testenden Substanzen direkt an den Ort gebracht, an dem sie ihre Wirkung entfalten sollen. Der Bau der Superpositionsaugen begünstigt die Durchführung dieser Versuche. Durch die Injektion selbst wird

im Auge nur eine geringe mechanische Beschädigung hervorgerufen, so daß die Funktion nicht oder nur in sehr begrenztem Maße beeinträchtigt wird (ANTON-ERXLEBEN & LANGER, 1987). Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit, die zu injizierenden Stoffe in geringen Volumina und in relativ hoher Konzentration zu injizieren. Damit wird ein großer Überschuß (500-700fach pro Auge, bezogen auf die Menge des an den Sehfärbstoff von Naturfutter-Tieren gebundenen Chromophors) von verwertbaren Molekülen in das Auge gebracht.

Durch die Injektion von Vitalfarbstoffen wurde gezeigt, daß sich die injizierten Substanzen rasch über das gesamte Auge verteilen. Der Farbstoff breitet sich von der Injektionsstelle proximad bis unter die Basallamina aus, ohne daß diese dabei mechanisch zerstört wird. Dabei wird deutlich, daß die Basallamina für Stoffe mit einem Molekulargewicht durchlässig ist, das dem der zu testenden Substanzen entspricht (≈ 300 für die Retinale, ≈ 600 für die Carotinoide, 479 für Rhodamin B). Die genaue Analyse der Farbstoffverteilung erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin B. Die goldgelbe Fluoreszenz des emittierten Lichtes (BOERNER, 1952) ist, wie der Kryotomschnitt in Abb. 17 zeigt, über das gesamte Auge verteilt. Die orange bis rote Färbung ist auf hohe Farbstoffkonzentrationen und daraus resultierende Fluoreszenzlöschung zurückzuführen, da Rhodamin B zu den Farbstoffen mit positiver Fluoreszenzlöschung gehört (d.h. mit steigender Farbstoffkonzentration nimmt die Fluoreszenz ab (HARMS, 1965)).

Die Rotfärbung auf dem Foto zeigt diejenige Färbung, die im Mikroskop bei normaler Hellfeldbeleuchtung zu erkennen ist. Ihr Auftreten, vor allem im Bereich der Retina, kann darauf zurückzuführen sein, daß die Rezeptormembranen durch das lipidfärbende Rhodamin B stärker angefärbt werden als die übrigen Strukturen. Dies würde für die ebenfalls lipidlöslichen Retinale bedeuten, daß auch sie von der Injektionsstelle bis zu den Rezeptorzellen gelangen können.

Die Injektionen in die Hämolymphe der Falter haben gezeigt, daß die Retinale zu einer Erhöhung des Sehfärbstoffgehaltes beitra-

gen, wogegen dieses für die Carotinoide nicht zu beobachten war. Somit stellt sich die Frage nach der Wirksamkeit dieser Substanzen, wenn sie direkt in das Auge gebracht werden, die Mobilisierung und der Transport aus den Speichern also wegfallen. Auch in diesem Fall hatten die Retinale die größte Wirkung auf eine Erhöhung des Sehfärbstoffgehaltes. Es muß dabei jedoch zwischen der Wirkung der reinen all-trans Retinale und derjenigen der Isomerengemische aus den bestrahlten all-trans Retinallösungen unterschieden werden.

Die Injektionen der reinen all-trans Retinale bewirkte einen Anstieg der Sehfärbstoffkonzentration auf 1,5 - 1,7 pmol/Retina. Dabei waren weder signifikante Unterschiede in Abhängigkeit von den Lichtverhältnisse nach der Injektion (LD bzw. DD) noch zwischen Retinal und 3-Hydroxyretinal festzustellen. Dieser Anstieg des Sehfärbstoffgehaltes bedeutet, daß das Augengewebe in begrenztem Umfang die Fähigkeit besitzt, aus den all-trans Isomeren die für den Einbau in den Sehfärbstoff benötigten 11-cis Isomere zu bilden, und zwar auch im Dunkeln.

Das Fehlen von Unterschieden aufgrund von Lichteinflüssen läßt darauf schließen, daß die notwendige Isomerisierung nicht nur durch Umgebungslicht (wie im Falle der Umwandlung von Metarhodopsin in Rhodopsin), sondern auch auf enzymatischem Wege geschieht. Dieser Befund läßt sich aus dem Bau der Superpositionsaugen verstehen: Die einzelnen Ommatidien sind im helladaptierten Zustand durch Schirmpigmente vollständig gegeneinander abgeschirmt (Abb. 4). Damit gelangt einfallendes Licht nur über die Cornea in das einzelne Rhabdom, und nicht in das umgebende Gewebe. Deshalb sind die Retinale im Cytoplasma mehr oder weniger abgeschirmt, eine Photoisomerisierung ist nur sehr schlecht möglich. Im dunkeladaptierten Zustand, wenn das Schirmpigment in die distale Lage gewandert ist, reicht wahrscheinlich die Lichtintensität für eine nennenswerte Isomerisierung der Retinale nicht mehr aus. Der geringe Anstieg des Sehfärbstoffgehaltes kann die Folge einer nur langsam ablaufenden Isomerisierung der all-trans Retinale sein. Das Fehlen der für die Isomerisierung notwendigen Enzyme zum Zeitpunkt der Injektion kann als Ursache für diese Be-

funde angesehen werden. Dies würde bedeuten, daß auch hier die benötigten Enzyme erst durch die Anwesenheit des Substrates induziert werden.

Die getesteten Carotinoide führen ebenfalls zu einer Steigerung der Sehfärbstoffmenge. Diese Moleküle müssen aber erst gespalten werden, bevor die Spaltprodukte als Chromophor an das Opsin gekoppelt werden können. Dies kann entweder durch zentrale Spaltung in zwei gleiche Hälften geschehen, oder das Molekül wird von einem Ende durch Abbau zum Retinal verkürzt. Es stellt sich hier die Frage, ob die Spaltung der Carotinoide ein unter natürlichen Bedingungen vorkommender Prozess ist oder ob es sich dabei um die unspezifische Wirkung von Enzymen handelt, die im Auge für andere Aufgaben benötigt werden. Offenbar sind die Retinale in den Imagines die für die Sehfärbstoffsynthese relevanten Moleküle und die Carotinoide spielen nur eine untergeordnete Rolle. Die Imagines von Schmetterlingen enthalten unter natürlichen Bedingungen mehr oder weniger große Mengen an Carotinoiden, die u.a. auch zur Färbung der Falter beitragen (FELTWELL & ROTHSCILD, 1974). Die Beantwortung der oben gestellten Frage hängt also letztlich davon ab, ob die Imagines auf diese Moleküle zur Sehfärbstoffsynthese zurückgreifen können oder müssen.

Die Injektion eines Isomerengemisches (Retinal* oder 3-Hydroxyretinal*, 2.2.4.) führte zu einem deutlich höheren Sehfärbstoffgehalt als die aller anderen Substanzen. Im Gegensatz zu den Injektionen der all-trans Retinale gab es Unterschiede zwischen der durch Injektion von Retinal* induzierten Sehfärbstoffmenge und derjenigen nach Injektion von 3-Hydroxyretinal*. Retinal* induzierte den höheren Sehfärbstoffgehalt ($3,34 \pm 0,78$ pmol/Retina), obwohl das 3-Hydroxyretinal* der natürlich vorkommende Chromophor ist ($2,3 \pm 0,53$ pmol/Retina).

Betrachtet man den zeitlichen Verlauf des Anstiegs des Sehfärbstoffgehaltes nach den Retinalinjektionen, so findet man auch hier Unterschiede zwischen Retinal* und 3-Hydroxyretinal* (3.3.5.). Für die Vorgänge im Auge im Anschluß an die Injektion von 3-Hydroxyretinal* ergibt sich aufgrund der erhaltenen Ergeb-

nisse folgendes Bild: Durch die Injektion wird in der "clear-zone" eine größere Menge 3-Hydroxyretinal* untergebracht, was mit der Einrichtung eines Depots verglichen werden kann. Die Proteinbiosynthese kann aufgrund des nun in ausreichender Menge vorhandenen Chromophors rasch einsetzen. Daraus resultiert ein schneller Anstieg der Sehfärbstoffmenge im injizierten Auge. Begünstigt durch den hydrophilen Charakter des 3-Hydroxyretinals setzt nach der Injektion eine stetige Abnahme seiner Konzentration entweder durch Diffusion in proximaler Richtung, den Einbau in den Sehfärbstoff oder Abtransport mit der Hämolymphe ein. Dies führt zu dem nach ca. 24 h langsamer werdenden Anstieg des Sehfärbstoffgehaltes (Abb. 21).

Die Injektion von Retinal* bewirkt ebenfalls die Anlage eines "Depots" in der "clear-zone". Das Retinal selbst vermag die Proteinbiosynthese offenbar nicht zu induzieren. Vor dem Einbau in den Sehfärbstoff muß es, wie die chromatographischen Untersuchungen des Sehfärbstoffes ergaben, hydroxyliert werden. Der zeitliche Verlauf der Sehfärbstoffbildung zeigt während der ersten 18 Stunden eine deutliche "lag-phase". Erst danach steigt der Sehfärbstoffgehalt steil an und erreicht nach ca. 72 h seinen Endwert. Während der "lag-phase" könnte die Hydroxylierung einer ausreichenden Menge des Retinals zum 3-Hydroxyretinal erfolgen. Sobald genug davon im Auge vorhanden ist, wird die Proteinbiosynthese induziert, und die Sehfärbstoffbildung beginnt.

Die höhere Endkonzentration des Sehfärbstoffes nach Retinalinjektion kann mit dessen im Vergleich zum 3-Hydroxyretinal stärker hydrophoben Charakter erklärt werden, der wegen der schlechteren Löslichkeit in der Hämolymphe einen Abtransport erschwert. Die Konzentration des Retinals nimmt deshalb langsamer ab als dies beim 3-Hydroxyretinal der Fall ist. Für die notwendige Hydroxylierungsreaktion steht so über einen längeren Zeitraum eine hohe Substratkonzentration zur Verfügung. Das aus dieser Reaktion hervorgehende 3-Hydroxyretinal kann dann die Proteinbiosynthese für längere Zeit induzieren und an das entstandene Opsin gekoppelt werden. Durch das mehr oder weniger sofortige "Abfangen" dieser Moleküle durch Bindung an das Opsin ist die Wahrscheinlichkeit

eines Abtransportes verringert. Die kontinuierliche "Nachlieferung" des Chromophors erklärt den stetig steigenden Sehfärbstoffgehalt.

Bei der Untersuchung von Tieren, bei denen nur jeweils in ein Auge injiziert wurde, konnten Unterschiede im Sehfärbstoffgehalt zwischen injizierten und nicht injizierten Augen festgestellt werden. Die Höhe der im nicht injizierten Augen gefundenen Sehfärbstoffmenge war von der Art des verwendeten Retinals abhängig. Nach der Injektion von 3-Hydroxyretinal* fanden sich im kontralateralen Auge bis zu 85% der Sehfärbstoffmenge des injizierten Auges. Im Falle des Retinals* betrug der Sehfärbstoffgehalt im kontralateralen Auge dagegen nur ca 40%. Aus dem oben diskutierten Verlauf der Sehfärbstoffbildung kann dieses Ergebnis gut verstanden werden: Der hohe Sehfärbstoffgehalt im nicht injizierten Auge beim 3-Hydroxyretinal beweist einen Austausch von Stoffen zwischen den beiden Augen. Dies kann entweder auf einem Transport über die Hämolymphe beruhen oder auf Diffusion zurückzuführen sein. Beides bedeutet aber eine Abnahme der Konzentration des injizierten 3-Hydroxyretinals und bedingt möglicherweise den langsamer werdenden Anstieg der Sehfärbstoffmenge. Die beim Retinal in den nicht injizierten Augen gefundene geringe Sehfärbstoffmenge läßt sich teilweise durch die schlechtere Löslichkeit in der Hämolymphe erklären, wodurch der Transport eingeschränkt wird. Andererseits muß aber auch im kontralateralen Auge zur Induktion der Sehfärbstoffsynthese zunächst die Hydroxylierung einer gewissen Menge des Retinals erfolgen, was zusammen mit dem Transport zu einer zeitlichen Verzögerung führt, die einen gleich schnellen Anstieg wie im injizierten Auge verhindert. Der Transport von bereits hydroxyliertem Retinal aus dem injizierten Auge scheint wenig wahrscheinlich, da dieses vermutlich wegen seiner niedrigen Konzentration und aufgrund sofortiger Bindung an das Opsin im Auge verbleibt.

4.4.5. Injektion radioaktiv markierter Aminosäuren

Die unterschiedlichen Opsinmengen, die in den Augen der Natur-

futter-Tiere und bei den Diät-Tieren in injizierten und kontralateralen nicht injizierten Augen gefunden wurden (Abb. 19), führten zu der Annahme, daß eine Neusynthese von Opsins nur in Anwesenheit des 3-Hydroxyretinals stattfindet. Bereits im Auge vorhandenes Opsin hätte nach der Extraktion der Retinae auf den Gelen zu finden sein müssen. Da dies aber nicht der Fall ist (die gefundenen Mengen stammen aus den immer vorhandenen geringen Sehfärbstoffmengen), wäre für das vorhandene Opsin zu fordern, daß es durch SDS-Extraktion nicht aus den Speichern innerhalb der Retina extrahiert werden kann, oder daß das Opsin in einer anderen Form -etwa in größeren Vorstufen, die vor Gebrauch modifiziert werden müssen- gespeichert wird. Da für diese Möglichkeiten aber keine Hinweise gefunden werden konnten, kann eine Neusynthese des Opsins als wahrscheinlich angesehen werden.

Durch die Injektion radioaktiv markierter Aminosäuren konnte diese Annahme bestätigt werden: Auf den Autoradiographien von Gelen, auf die Extrakte entsprechend vorbehandelter Augen (2.7.) aufgetragen worden waren, konnten durch die Schwärzung der Opsinbande der Einbau tritiiertter Aminosäuren in das Opsin und damit eine Proteinbiosynthese nachgewiesen werden. Die anderen, ebenfalls markierten Proteine sind einerseits auf den normalen Stoffwechsel im Auge zurückzuführen, andererseits werden außer dem Opsin noch andere Proteine zum Aufbau eines normalen Rhabdoms benötigt, die vielleicht gleichzeitig im Auge synthetisiert werden. Diese Annahme unterstützen elektronenmikroskopische Untersuchungen, die bei den Diät-Tieren ein kaum entwickeltes Rhabdom zeigen, das nach der Injektion von Retinal eine "normale" Struktur aufweist (ANTON-ERXLEBEN & LANGER, 1987).

Zur Induktion der Proteinbiosynthese wurde 3-Hydroxyretinal gewählt, weil dadurch ein rascher Anstieg des Sehfärbstoffgehaltes (ohne "lag-phase") erreicht wird (3.3.6.). Dies erscheint sinnvoll, um den Einbau der markierten Aminosäuren nachzuweisen, bevor sie aufgrund des Turnover aus dem Auge verschwunden sind. Wenn man den Einbau der markierten Aminosäuren der Entwicklung des Sehfärbstoffgehaltes nach Injektion von 3-Hydroxyretinal gegenübergestellt (Abb. 22), wird deutlich, daß die beiden Kur-

ven einen mehr oder weniger parallelen Verlauf haben, woraus auf einen Zusammenhang zwischen dem Anstieg des Sehfärbstoffgehaltes und der Proteinbiosynthese geschlossen werden kann.

Diese Ergebnisse zeigen, daß für Spodoptera eine in der Literatur für andere Spezies diskutierte Hypothese nicht zutrifft: So soll während des Tag/Nacht-Rhythmus bei Krabben das Opsin oder Rhodopsin tagsüber im Auge -in nicht näher bekannten Strukturen- gespeichert werden, um dann, bei einer ausreichend hohen Konzentration des Chromophors oder durch äußere Reize (Licht) mobilisiert zu werden (ARIKAWA, et al., 1987). Eine solche Speicherung ist bei Spodoptera -im Gegensatz zu Tieren mit rhythmischen Änderungen- nicht nötig, da der Sehfärbstoff nur einmal aufgebaut werden muß und durch eine geringe Neusyntheserate auf einem hohen Niveau gehalten werden kann. Durch die Tageszeit bedingte Lichtschwankungen werden von den nachtaktiven Faltern dadurch ausgeglichen, daß sie sich während der hellen Tageszeit in dunklen Verstecken aufhalten. Damit wird eine Reduktion der Rhabdomgröße zur Herabsetzung der Empfindlichkeit überflüssig und ein hoher Sehfärbstoff- und Membran-Turnover vermieden.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte die Bedeutung von Nahrungs-carotinoiden und der Einfluß von Licht auf den Sehfärbstoffgehalt der Augen von Spodoptera littoralis untersucht werden. Dazu wurden zunächst die einzelnen Sehfärbstoffe und deren Gesamtkonzentration im Auge spektralphotometrisch bestimmt. Die Komponenten der Sehfärbstoffe (Opsin, Chromophor) wurden mit chromatographischen Methoden charakterisiert. Die Bedeutung von Carotinoiden als Vorstufe für den Chromophor der Sehfärbstoffe wurde durch Zugabe dieser Substanzen zu einer Carotinoid-armen Diät getestet. Durch Injektion von Carotinoiden und Retinoiden in unterschiedliche Entwicklungsstadien der Versuchstiere wurde der Einfluß dieser Substanzen auf die Sehfärbstoffsynthese der Imagines untersucht. Die Wirkung von Licht auf den Sehfärbstoffgehalt des Auges wurde zusätzlich zum Wildtyp auch an einer schirmpigmentarmen Mutante untersucht.

1. Das Sehfärbstoffsystem von S. littoralis besteht aus vier verschiedenen Sehfärbstoffen, von denen in Digitonin-Extrakten nur der grüne (R₅₃₀), der blaue (R₄₇₉) und der UV-Sehfärbstoff (R₃₆₁) nachgewiesen werden können. Bei der Proteinkomponente der Sehfärbstoffe, dem Opsin, handelt es sich um Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von ca. 40.000. Der Chromophor des Sehfärbstoffes ist 3-Hydroxyretinal.

2. Der Sehfärbstoffgehalt von S. littoralis in den Komplexaugen der Imagines beträgt nach Aufzucht der Raupen mit unterschiedlichen Futterpflanzen $8,5 \pm 2,9$ pmol/Retina. Die Aufzucht mit einer Vitamin A-armen Diät führt zu einem auf $0,7 \pm 0,4$ pmol/Retina verringerten Sehfärbstoffgehalt. Ein niedriger Sehfärbstoffgehalt bedingt auch eine geringe Opsinkonzentration im Auge. Die Zugabe von Zeaxanthin zu der Diät der Raupen bewirkt einen normalen Sehfärbstoffgehalt, der demjenigen nach Aufzucht mit Naturfutter entspricht. Die Zugabe nicht hydroxylierter Carotinoide führte nicht zu einer Erhöhung des Sehfärbstoffgehaltes. Als Ursache dafür wurde mangelnde Resorption dieser Substanzen aus dem Darminhalt festgestellt.

3. Die Hälterung von Naturfutter-Tieren der gelbäugigen Mutante von S. littoralis, die eine starke Reduktion der Omochrom-Schirmpigmente aufweist, in einem normalen Tag/Nacht-Rhythmus führt zu einer deutlichen Verringerung des Sehfärbstoffgehaltes ($1,4$ pmol/Retina) gegenüber den im Dauerdunkel gehaltenen Imagines (10 pmol/Retina). Bei Imagines, deren Raupen mit der Carotinoid-armen Diät aufgezogen worden sind, ist ebenfalls eine lichtabhängige Reduktion des Sehfärbstoffgehaltes von $0,8$ auf $0,25$ pmol/Retina zu beobachten.

4. Von den Raupen können nur C₄₀-Carotinoide als Vorstufe für den Chromophor des Sehfärbstoffes verwendet werden. Auch β -Carotin wird -wenn es in die Hämolymphe injiziert wurde- als Vorstufe verwendet, kann jedoch von den Raupen nicht aus der Nahrung resorbiert werden. Die Injektion von Retinalen in die Raupen hat keinen erhöhenden Einfluß auf den Sehfärbstoffgehalt.

Werden die Vorstufen durch Injektion in die Hämolymphe der

Imagines appliziert, so sind die Retinale für die Induktion der Sehfärbstoffsynthese von Bedeutung, wogegen Carotinoide in diesem Fall den Sehfärbstoffgehalt in den Augen nicht erhöhen.

Werden die zu testenden Substanzen direkt in die Augen injiziert, so bewirken Retinal und 3-Hydroxyretinal den größten Anstieg des Sehfärbstoffgehaltes (auf 3,3 bzw. 2,3 pmol/Retina). Nach dieser Applikation bewirken auch β -Carotin (1,4 pmol/Retina) und Zeaxanthin (1,5 pmol/Retina) -im Gegensatz zur Injektion in die Hämolymphe- eine Steigerung des Sehfärbstoffgehaltes.

Das in die Augen injizierte Retinal wird als 3-Hydroxyretinal in den Sehfärbstoff eingebaut; das Augengewebe besitzt also die Fähigkeit zur Hydroxylierung des Retinals.

Nach Injektion der Retinale in nur ein Auge kommt es auch zu einem Anstieg des Sehfärbstoffgehaltes im kontralateralen Auge. Bei Injektion von 3-Hydroxyretinal beträgt der Sehfärbstoffgehalt im kontralateralen Auge ca. 85% der im injizierten Auge gefundenen Menge, im Falle des Retinals werden dagegen nur ca. 40% erreicht.

Die Induktion der Proteinbiosynthese nach Retinalinjektionen kann durch Applikation von 3-Hydroxyretinal und ^3H -markierten Aminosäuren nachgewiesen werden. Der Anstieg des Sehfärbstoffgehaltes ist mit einer Neusynthese des Opsins verknüpft. Eine Mobilisierung aus "Speichern" kann ausgeschlossen werden.

Die Injektion von 3-Hydroxyretinal führt zu einem raschen Anstieg des Sehfärbstoffgehaltes nach der Injektion, wogegen nach der Injektion von Retinal eine Verzögerung von 18 Stunden zu beobachten ist. Diese wird auf die erforderliche Hydroxylierung des Retinals vor der Induktion der Protein-Synthese und der Koppelung an das Opsin zurückgeführt.

5. Literaturverzeichnis

- AGEE, H.R.: Adult Beet Armyworm and Fall Armyworm: histology of the compound eye. *Florida Entom.* 58, 165-166 (1975)
- ANTON-ERXLEBEN, F., LANGER, H.: Dependence on carotenoids of photoreceptor ultrastructure in Spodoptera littoralis (Lepidoptera, Noctuidae). *Europ. J. Cell Biol.* 45, 102-106 (1987)
- ARIKAWA, K., KAWAMATA, K., SUZUKI, T., EGUCHI, E.: Daily changes of structure, function and rhodopsin content in the compound eye of the crab Hemigrapsus sanguineus. *J. Comp. Physiol. A* 161, 161-174 (1987)
- BAUMANN, C.: English translation of Boll's on the Anatomy and Physiology of the Retina and of Kühne's Chemical Processes in the Retina. *Vision Res.* 17, 1245-1327 (1977)
- BISHARA, I.: The cotton worm in Egypt. *Bulletin de la Société Royale Entomologique d'Egypte* 3, 288-340 (1934)
- BOERNER, D.: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Lipoiden. *Protoplasma* 41, 168 (1952)
- BRITTON, G.: General carotenoid methods. in *Methods in Enzymology* Vol. 111, 113-149 Academic Press, San Diego (1985)
- BRUENING, R.C., DERGUINI, F., NAKANISHI, K.: Rapid high-performance liquid chromatographic analysis of retinal mixtures. *J. Chromatogr.* 361, 437-441 (1986)
- CARLSON, S.D., STEEVES, H.R.III., VAN DE BERG, J.S., ROBBINS, W.E.: Vitamin A deficiency: effect on retinal structure of the moth Manduca sexta. *Science* 158, 268-270 (1967)
- DAVSON, H.: The eye. Vol 2B 2nd Ed.: Photobiology of vision. Academic Press, New York & London (1977)
- DIMETRY, N.Z.: A successful technique for mass rearing of the Cotton Leaf Worm Spodoptera littoralis Boisd. on an artificial diet. *Z. angew. Entomol.* 66, 408-411 (1970)
- DIMETRY, N.Z.: Further studies on the host plant preference of Spodoptera littoralis Boisd. (Lepidoptera, Noctuidae). *Z. angew. Entomol.* 71, 350-355 (1972)
- DITTRICH, V., LUETKEMEIER, N.: Eye color in Spodoptera littoralis and its independence from genes causing resistance to monoterpenes. *J. Econ. Entomol.* 73, 353-355 (1980)
- EAKIN, R.M., BRANDENBURGER, J.L.: Effects of light and dark on photoreceptor cells in the polychaete annelid Nereis limnicola. *Cell Tissue Res.* 24, 613-622 (1985)
- EXNER, S.: Die Physiologie der facettierten Augen von Krebsen und Insecten. Deuticke, Leipzig-Berlin (1891)
- FELTWELL, J., ROTHSCILD, M.: Carotenoids in 38 species of Lepidoptera. *J. Zool. Lond.* 174, 441-465 (1974)

- HALL, M.D., BOK, D.: Borane dimethylamine reduction of retinal-opsin linkage in rhodopsin. pp 290-293 in L. PACKER (Hrsg.): Methods in Enzymology 81/H, Academic Press, San Diego (1982)
- HARMS, H.: Handbuch der Farbstoffe für die Mikroskopie. Stauten Verlag, Kamp-Lintford (1965)
- HENNING, U.: Der diurnale Turnover der Photorezeptormembran im Komplexauge der terrestrischen Krabbe Ocypode ryderi. Dissertation, Bochum (1986)
- HEUKESHOVEN, J., DERNICK, R.: Vereinfachte und universelle Methode zur Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen: Bemerkungen zum Mechanismus der Silberfärbung. LKB-Schriftenreihe SD-RE 034
- HÖGLUND, G.: Pigment migration, light screening and receptor sensitivity in the compound eyes of nocturnal Lepidoptera. Acta Physiol. Scand. 69, Suppl. 282 (1966)
- HUBBARD, R.; BROWN, P.K.; BOWNS, D.: Methodology of Vitamin A and visual pigments. pp 615-653 in Methods in Enzymology 18C. Academic Press, New York and London (1971)
- ISLER, O.: Carotenoids. Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart (1971)
- ITO, M., MATSUOKA, N., TSUKIDA, K., SEKI, T.: Retinoids and related compounds X. Synthesis of geometrical isomers of ($\pm$)-2- and ($\pm$)-3-hydroxyretinoids and identification of the chromophore of the fly visual pigment. Chem. Pharm. Bull. Tokyo 36, 78-86 (1988)
- KAYSER, H.: Carotenoids in insects. pp 195-210 in G. BRITTON, T.W. GOODWIN (Hrsg.): Carotenoid chemistry and biochemistry, Pergamon Press, Oxford (1982)
- KIRSCHFELD, K., HARDIE, R., LENZ, G., VOGT, K.: The pigment system of the photoreceptor 7 yellow in the fly, a complex photoreceptor. J. Comp. Physiol. A 162, 421-433 (1988)
- KRINSKY, N.I.: Carotenoid protection against oxidation. Pure appl. Chem. 51, 649-660 (1979)
- LANGER, H., HAMANN, B., MEINECKE, C.C.: Tetrachromatic visual system in the moth Spodoptera exempta. J. Comp. Physiol. 129, 235-239 (1979)
- MEINECKE, C.C.: The fine structure of the compound eye of the African Armyworm Moth, Spodoptera exempta Walk.. Cell Tissue Res. 216, 333-347 (1981)
- MEINECKE, C.C., LANGER, H.: Localization of visual pigments with in rhabdoms of the compound eye of Spodoptera exempta (Insecta, Noctuidae). Cell Tissue Res. 238, 359-368 (1984)
- PAULSEN, R., SCHWEMER, J.: Studies on the insect visual pigment sensitive to UV-light: retinal as the chromophoric group. Biochim. Biophys. Acta 283, 520-529 (1972)

- PAULSEN, R., SCHWEMER, J.: Biogenesis of blowfly photoreceptor membranes is regulated by 11-cis retinal.
Eur. J. Biochem. 137, 609-614 (1983)
- PEPE, I.M., SCHWEMER, J.: An improved HPLC-method for the separation of retinaldehyde isomers from visual pigments.
Photochem. Photobiol. 45, 679-681 (1987)
- SCOLNIK, P.A.: Biosynthesis and function of carotenoids in plants. pp 383 in J.L. MCINTOSH (Hrsg.): Plant Gene Systems and their Biology, UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology - New Series Vol. 62 (1987)
- SEKI, T., FUJISHITA, S., ITO, M., MATSUOKA, N., KOBAYASHI, C., TSUKIDA, K.: A fly, *Drosophila melanogaster*, forms 11-cis 3-hydroxyretinal in the dark. Vision Res. 26, 255-258 (1986)
- SEKI, T., FUJISHITA, S., ITO, M., MATSUOKA, N., TSUKIDA, K.: Carotenoid composition in the compound eyes of insects.
Exp. Biol. 47, 95-103 (1987)
- SHELTON, P.M.J., GATEN, E., CHAPMAN, C.J.: Light and retinal damage in *Nephros norvegicus* (L.) (Crustacea). Proc. Royal Soc. Lond. Series B 226, 217-236 (1985)
- SÖRENSEN, S.P.L.: Enzymstudien II. Über die Messung und die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration bei enzymatischen Prozessen. Biochem. Z. 21, 131 (1909)
- STAVENGA, D.G., SCHWEMER, J.: Visual pigments of invertebrates. pp 11-61 in M.A. ALI (Hrsg): Photoreception and vision in invertebrates. Plenum Publishing Company (1984)
- STARK, W.S., CARLSON, S.D.: Blue and ultraviolet light induced damage to the *Drosophila* retina: ultrastructure.
Current Eye Res. 3, 1441-1454 (1984)
- TAKAGI, S.: Determination of green leaf carotenoids by HPLC.
Agr. Biol. Chem. Tokyo 49, 1211-1213 (1985)
- VOGT, K.: Is the fly visual pigment a rhodopsin?
Z. Naturforsch. 38c, 329-333 (1983)
- VOGT, K.: The chromophore of the visual pigment in some insect orders. Z. Naturforsch. 39c 196-197 (1984)
- VOGT, K.: Naming visual pigments.
J. Photochem. Photobiol. B 2, 133-134 (1988)
- VOGT, K.: Chromophores of insect visual pigments.
Photobiochem. Photobiophys. Suppl. 273-296 (1987)
- VOGT, K., KIRSCHFELD, K.: C₄₀-Carotinoide in Fliegenaugen.
Verh. Dtsch. Zool. Ges. 1983, 330
- VOGT, K., KIRSCHFELD, K.: Chemical identity of the chromophores of fly visual pigment.
Naturwissenschaften 71, 211-212 (1984)
- WALD, G.: Vitamin A in the retina. Nature 132, 316-317 (1933)

- WALD, G.: Carotenoids and the Vitamin A cycle in vision.
Nature 134, 65 (1939)
- WEBER, H., WEIDNER, H.: Grundriß der Insektenkunde. Verlag Gustav Fischer, Stuttgart-New York (1974)
- WHITE, M.P., FISHER, L.J.: Degree of light damage to the retina varies with time of day of bright light exposure.
Physiol. Behav. 39, 607-613 (1987)
- WYNIGER, R.: Insektenzucht - Methoden der Zucht und Haltung von Insekten und Milben im Laboratorium. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart (1974)
- YAGI, N., KOYAMA, N.: The compound eye of Lepidoptera. Shinkyo Press, Tokyo (1963)

Mein Dank gilt

- Herrn Prof. Dr. H. Langer für die Überlassung des Themas und eines Arbeitsplatzes sowie die Unterstützung und Betreuung bei der Durchführung der Arbeit.
- Herrn Dr. Dr. M. Halbach (Rheinische Landesklinik, Düsseldorf) für die Benutzung der HPLC-Anlage.
- Herrn Dr. U. Henning für die Hilfestellung bei der Durchführung der HPLC-Analysen und die Methodik der Elektrophorese.
- Herrn Dr. A. Pelzer für die Anregungen bei der Aufzucht und Pflege der Versuchstiere und kritische Diskussionen.
- Frau Dr. D. Zimmermann für die Überlassung der elektronenmikroskopischen Aufnahme (Abb. 23).
- Frau Dipl.-Biol. G. Schmeinck-Jung u.a. für die Hilfe bei der Berechnung der Absorptionskurven der Sehfärbstoffe und die kritische Durchsicht des Manuskriptes.
- Frau Dipl.-Biol. B. Röhl für die gute Zusammenarbeit und vielfältige Anregungen.
- Frau I. Paas für die Anfertigung der fotografischen Abzüge für diese Arbeit sowie die Fotografie der Gele und Dünnschichtplatten.
- Frau G. Frank für die technische Hilfe bei der Durchführung einiger Experimente.

Lebenslauf

Martin Pieper
Lange Wende 110
5760 Arnsberg 1

Geboren am : 13.07.57
Geburtsort : Neheim-Hüsten, jetzt Arnsberg
Familienstand : ledig

Grundschule : 04.64 - 06.68
St.-Johannes-Grundschule, Neheim
Gymnasium : 08.68 - 06.77
Franz-Stock-Gymnasium, Arnsberg

Grundwehrdienst : 07.77 - 09.78

Universität : 10.78 - 09.84 Studium der Biologie an der
Ruhr-Universität Bochum

Abschluß : 09.84 Diplom (Prüfungsfächer:
Zoologie, Mikrobiologie, Immunologie)

Diplomarbeit am Lehrstuhl für Tierphysio-
logie (Prof. Dr. H. Langer)
Thema: Untersuchungen zum Stoffumsatz in den
Facettenaugen des Nachtschmetterlings
Spodoptera

Promotion : 10.84 - 10.88 am Lehrstuhl für
Tierphysiologie (Prof. Dr. H. Langer),
Ruhr-Universität Bochum

